

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 7 月 17 日 (17.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/058233 A1(51) 国際特許分類: G01N 33/15, 33/50, 33/566,
A61K 45/00, A61P 31/10, C07K 14/195

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/13807

(22) 国際出願日: 2002 年 12 月 27 日 (27.12.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2001-401947
2001 年 12 月 28 日 (28.12.2001) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザ
イ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東
京都 文京区 小石川 4 丁目 6 番 10 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

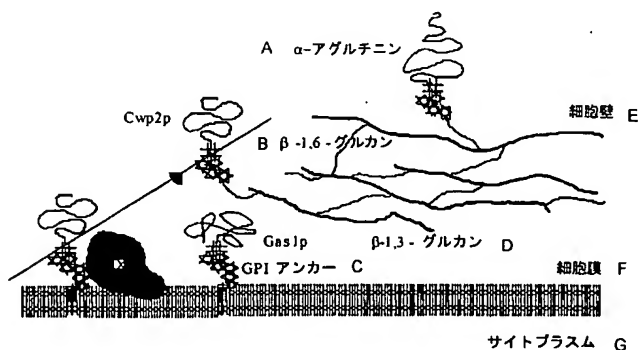
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 塚原 克平

(TSUKAHARA, Kappei) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城
県 つくば市 二の宮 4-4-24 Ibaraki (JP). 佐藤
俊孝 (SATO, Toshitaka) [JP/JP]; 〒301-0042 茨城
県 竜ヶ崎市 長山 8-6-7 Ibaraki (JP). 中本 和孝
(NAKAMOTO, Kazutaka) [JP/JP]; 〒305-0031 茨城
県 つくば市 吾妻 3-15-8 ヒロ・ビザージュ
402 Ibaraki (JP). 土谷 満美子 (TSUCHIYA, Mamiko)
[JP/JP]; 〒300-1216 茨城県 牛久市 神谷 6 丁目 22-1
シエルヒープ B-103 Ibaraki (JP). 相根 康司
(SAGANE, Koji) [JP/JP]; 〒305-0061 茨城県 つくば市
稲荷前 9-7 つくばね第 2 寮 303 Ibaraki (JP).(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビ
ル 6 階 Ibaraki (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF SCREENING COMPOUND HAVING FUNGAL CELL WALL SYNTHESIS INHIBITORY ACTIVITY

(54) 発明の名称: 真菌細胞壁合成阻害活性を有する化合物をスクリーニングする方法

A...α-AGGLUTININ
B...β-1,6-GLUCAN
C...GPI ANCHORD...β-1,3-GLUCAN
E...CELL WALL
F...CELL MEMBRANE
G...CYTOPLASM(57) Abstract: By a simple binding assay with the
use of a membrane fraction in which GWT1 pro-
tein is expressed, a compound inhibiting the trans-
port of GPI anchor protein to fungal cell wall can be
screened.

(57) 要約:

GWT1 蛋白を発現した膜画分を用いた簡単な Binding assay により、GPI アンカ
ー蛋白質の真菌細胞壁への輸送を阻害する化合物がスクリーニング可能となった。

BEST AVAILABLE COPY



WO 03/058233 A1



LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

真菌細胞壁合成阻害活性を有する化合物をスクリーニングする方法

技術分野

真菌の細胞壁合成に関与する蛋白質と結合する抗真菌剤をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

本発明者らは、真菌が病原性を発揮するためには宿主細胞に付着することが重要であり、付着に関与する付着因子は一旦細胞膜に GPI

(Glycosylphosphatidylinositol) アンカリングした後、細胞壁表層に輸送されることに着目した (Hamada K et al, Mol. Gen. Genet., 258: 53-59, 1998)。そして GPI でアンカリングされた蛋白質 (GPI アンカー蛋白質) が細胞壁に輸送される過程を阻害することにより、真菌細胞壁の合成を阻害し、同時に宿主細胞への付着も阻害する新規抗真菌剤が創出できると考えて研究に着手した。

発明の開示

本発明の課題は、真菌細胞壁への GPI アンカー蛋白質の輸送を阻害して真菌細胞壁の合成を阻害するとともに、宿主細胞への付着を阻害して、病原性真菌が病原性を発揮できないようにする抗真菌剤を開発することにある。

本発明者らは、*Saccharomyces cerevisiae* において配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA がコードする蛋白質が、*Candida albicans* において配列番号 3 及び 5 に記載の塩基配列を有する DNA がコードする蛋白質が、*Schizosaccharomyces pombe* において配列番号 27 に記載の塩基配列を有する DNA がコードする蛋白質が、*Aspergillus fumigatus* において配列番号 39 及び 41 に記載の塩基配列を

- 2 -

有する DNA がコードする蛋白質が、Cryptococcus neoformans において配列番号 54 及び 58 に記載の塩基配列を有する DNA がコードする蛋白質が、GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に関与することを見出し GWT1 遺伝子と命名した。更に、該遺伝子を欠失した真菌が不完全な細胞壁しか合成できないこと、式(Ia)に示す化合物が該蛋白質と結合して、GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送を阻害し、真菌の細胞壁合成を阻害することを見出した。

そして、標識した式(Ia)に示す化合物と拮抗して該蛋白質に結合する化合物が、真菌細胞壁の合成を阻害することを見出して、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、下記 1 から 7 を提供するものである。

1. 抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (1). 下記 (a) から (e) のいずれかに記載の DNA によりコードされる蛋白質と、被検試料及び該蛋白質に結合活性を有する標識化合物とを接触させる工程、
 - (a) 配列番号：2、4、6、28、40 または 59 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA
 - (b) 配列番号：1、3、5、27、39、41、54 または 58 に記載の塩基配列を含む DNA
 - (c) 配列番号：1、3、5、27、39、41、54 または 58 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA
 - (d) 配列番号：2、4、6、28、40 または 59 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失、置換および／または挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA
 - (e) 配列番号：29 及び 31 あるいは配列番号：29 及び 30 をプライマーとして増幅される DNA、
 - (2). 該蛋白質に結合する標識化合物を検出する工程、
 - (3). 該蛋白質に結合する標識化合物を減少させる被検試料を選択する工程、を含む方法。

- 3 -

ここで、「ストリンジェントな条件」とは、例えば 65°C 4 x SSC におけるハイブリダイゼーション、次いで 65°C で 1 時間 0.1 x SSC 中での洗浄である。また別法としてストリンジェントな条件は、50%ホルムアミド中 42°C 4 x SSC である。また、PerfectHyb™ (TOYOBO) 溶液中 65°C 2.5 時間ハイブリダイゼーション、次いで 1). 2xSSC, 0.05% SDS 溶液 : 25°C 5 分、2). 2xSSC, 0.05% SDS 溶液 : 25°C 15 分、3). 0.1xSSC, 0.1% SDS 溶液 50°C 20 分の洗浄といった条件も許される。

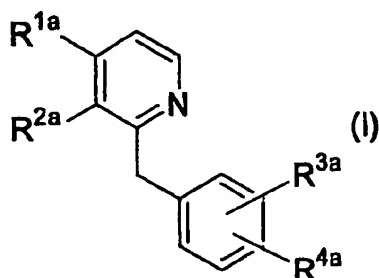
また、「1 若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失、置換および／または挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質」は、当業に公知の方法、例えば、部位特異的変異誘発法 (Sambruck, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) などを用いて調製することができる。また、このような変異は自然界において生じることもある。アミノ酸の変異数は、標識化合物との結合活性が保持される限り特に制限はない。典型的には、30 アミノ酸以内であり、好ましくは、10 アミノ酸以内であり、さらに好ましくは 3 アミノ酸以内である。アミノ酸の変異部位も、上記活性が保持される限り特に制限はない。

上記ハイブリダイゼーションを利用して調製される蛋白質や変異蛋白質は、通常、配列番号 : 2、4、6、28、40 または 59 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質とそのアミノ酸配列において高い相同性 (例えば、60% 以上、70% 以上、80% 以上、90% 以上、あるいは 95% 以上の相同性) を有する。アミノ酸配列の相同性は、BLASTx (アミノ酸レベル) のプログラム (Altschul et al. *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990) を利用して決定することができる。該プログラムは、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, 1990、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877, 1993) に基づいている。BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えば score = 50、wordlength = 3 とする。また、Gapped BLAST プログラムを用いて、アミノ酸配列を解析する場合は、Altschul ら (*Nucleic Acids*,

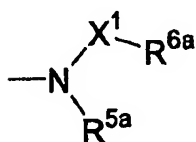
- 4 -

Res.25:3389-3402, 1997) に記載されているように行うことができる。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメータを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.)。

2. 該蛋白質に結合活性を有する標識化合物が、一般式(I)



[式中 R^{1a} および R^{2a} は同一または相異なってそれぞれ水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、置換されてもよい C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、置換されてもよい C_{1-6} アルコキシ基、または式



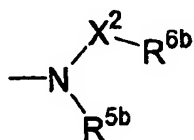
(式中 X^1 は単結合、カルボニル基、または式 $-S(O)_2-$ で表わされる基を意味する；

R^{5a} および R^{6a} は同一または相異なって、水素原子、または置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基を示す。また、 R^{1a} と R^{2a} は一緒になって、置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいピロール環、置換されていてもよいチオフェン環、置換されていてもよいフラン環、置換されていてもよいピリダジン環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいピラジン環、置換されていてもよいイミダゾール環、置換されていてもよいオキサゾール環、置換されていてもよいチアゾール環、置換されていてもよいピラゾール環、置換されていてもよいイソ

- 5 -

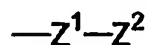
オキサゾール環、置換されていてもよいイソチアゾール環、置換されていてもよいシクロヘキサン環、および置換されていてもよいシクロペンタン環からなる群から選ばれる縮合環を形成してもよい；

R^{3a} 、および R^{4a} は同一または相異なってそれぞれ、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、ホルミル基、ヒドロキシイミノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、式 $-C(O)NR^{7a}R^{7b}$ (式中、 R^{7a} および R^{7b} は同一または相異なってそれぞれ水素原子、または C_{1-6} アルキル基を意味する)、式 $-CO_2R^{7a}$ (式中、 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する)、式 $-S(O)_nR^{7a}$ (式中、 n は 0 ないし 2 の整数を意味する。 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する)、式 $-S(O)_2NR^{7a}R^{7b}$ (式中、 R^{7a} および R^{7b} は前記定義と同意義を意味する)、式



(式中 X^2 は単結合、カルボニル基、または式 $-S(O)_2-$ で表わされる基を意味する；

R^{5b} および R^{6b} は同一または相異なっていて、水素原子、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基、または置換されていてもよい C_{6-14} アリール基を意味する) で表わされる基、または式



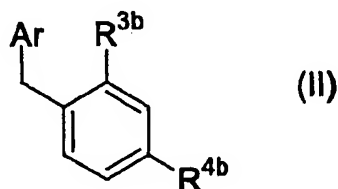
(式中、 Z^1 は単結合、酸素原子、ビニレン基、またはエチニレン基を意味する；

Z^2 は単結合、または 0 ないし 4 個の置換基で置換されてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基を意味する。 R^{3a} と R^{4a} は一緒になって、メチレンジオキシ基、または 1,2-エチレンジオキシ基を意味してもよく、また R^{3a} と R^{4a} は一緒になって、置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいピロール環、置換されていてもよいチオフェン環、置換されていてもよいフラン環、置換されていてもよいピリダジン環、置換されて

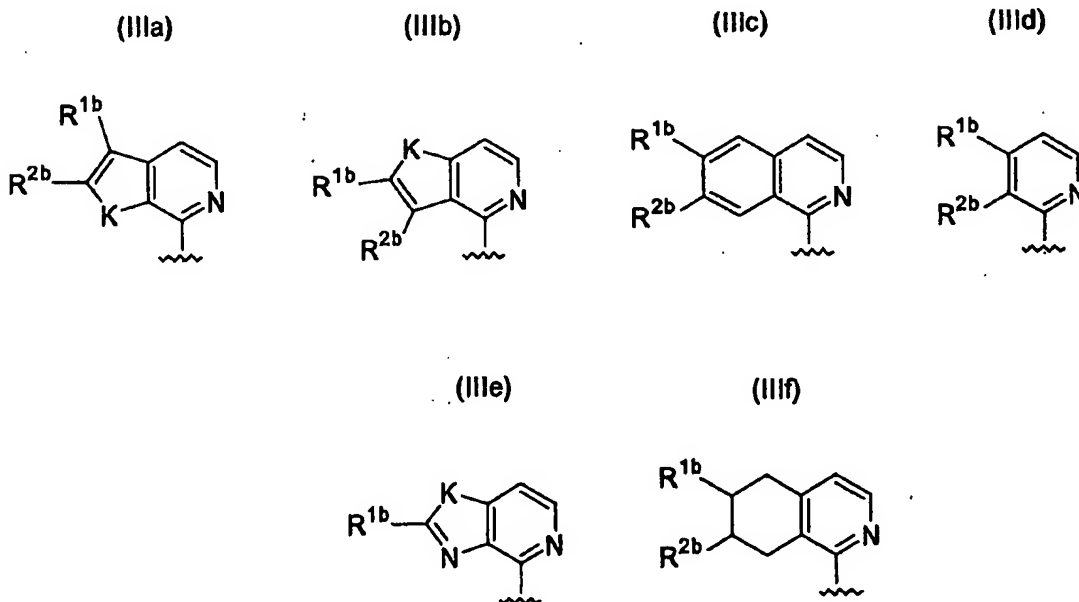
- 6 -

いてもよいピリミジン環、置換されていてもよいピラジン環、置換されていてもよいイミダゾール環、置換されていてもよいオキサゾール環、置換されていてもよいチアゾール環、置換されていてもよいピラゾール環、置換されていてもよいイソオキサゾール環、置換されていてもよいイソチアゾール環、置換されていてもよいシクロヘキサン環および置換されていてもよいシクロペンタン環からなる群から選ばれる縮合環の形成を意味してもよい。ただし、 R^{1a} および R^{2a} がともに水素原子を意味する場合は除く。〕で示される化合物である、1に記載の方法。

3. 該蛋白質に結合活性を有する標識化合物が、一般式(II)



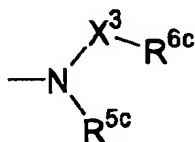
〔式中 Ar は下記式 (IIIa) - (IIIf) からなる群



(式中、K は硫黄原子、酸素原子、または式 -NH- で表わされる基を意味する；

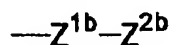
- 7 -

R^{1b} 、 R^{2b} は同一または相異なってそれぞれ水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基、置換されていてもよい C_{1-6} アルコキシ基、式



(式中 X^3 は単結合、カルボニル基、または式 $-S(O)_2-$ で表わされる基を意味する； R^{5c} および R^{6c} は同一または相異なっていて、水素原子、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基、または式 $-X^4-R^{8a}$ (式中、 X^4 は、単結合、酸素原子、または硫黄原子を意味する； R^{8a} は C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、 C_{3-8} シクロアルキル基、または C_{3-8} シクロアルケニル基を意味する) で表わされる基を示す。また、 R^{1b} 、 R^{2b} は一緒になってメチレンジオキシ基、または 1,2-エチレンジオキシ基を形成してもよい。) から選ばれる置換基を意味する；

R^{3b} 、および R^{4b} は同一または相異なってそれぞれ、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、ホルミル基、ヒドロキシイミノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、または式、

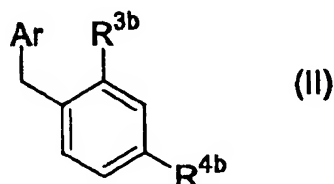


(式中、 Z^{1b} は単結合、ビニレン基、またはエチニレン基を意味する； Z^{2b} は単結合、または 0 ないし 4 個の置換基で置換されてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基を意味する。；

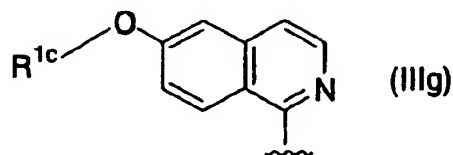
ただし (1) Ar が、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子である前記式 (III d) で表わされる場合、(2) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、メトキシ基、水酸基、メチル基、ベンジルオキシ基、またはハロゲン原子であり、Ar が、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子またはメトキシ基を意味す

る前記式 (IIIc) で表わされる場合、(3) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、水酸基、メトキシ基、またはベンジルオキシ基であり、Ar が、 R^{1b} および R^{2b} がともに水酸基またはベンジルオキシ基を意味する前記式 (IIIc) で表わされる場合、または (4) Ar が、 R^{1b} が水素原子で R^{2b} がホルミル基、ヒドロキシメチル基またはメトキシカルボニル基である前記式 (IIIId) で表わされる場合を除く。] で示される化合物である、1 に記載の方法。

4. 該蛋白質に結合活性を有する標識化合物が、一般式(II)

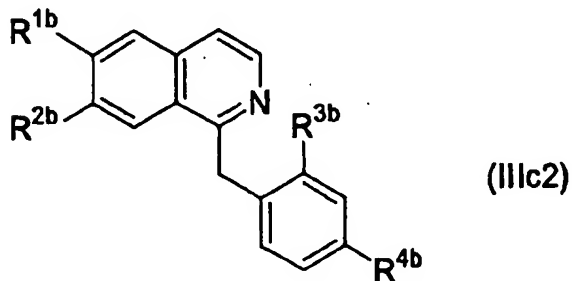


〔式中 Ar が式、



(式中、 R^{1c} が水素原子、置換されてもよい C_{1-6} アルキル基、ベンジル基を意味する。) で表わされ、かつ R^{3b} が水素原子を意味する場合を除いた〕で表される化合物である、1 に記載の方法。

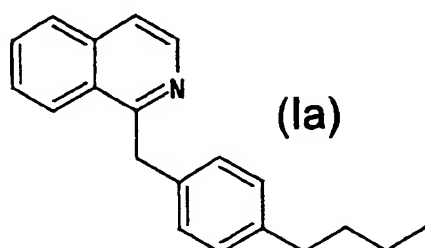
5. 該蛋白質に結合活性を有する標識化合物が、一般式(IIIc2)



- 9 -

〔式中 R^{1b} 、 R^{2b} は前記定義と同意義を意味する。ただし、(1) R^{1b} が式 $R^{1c}-O-$ (式中、 R^{1c} は前記定義と同意義を意味する) で表わされる基であり、 R^{2b} が水素原子であり、 R^{3b} が水素原子を意味する場合、(2) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、メトキシ基、水酸基、メチル基、ベンジルオキシ基、またはハロゲン原子であり、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子またはメトキシ基を意味する場合、または(3) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、水酸基、メトキシ基、またはベンジルオキシ基であり、 R^{1b} および R^{2b} がともに水酸基またはベンジルオキシ基を意味する場合を除く。〕で表される化合物である、1に記載の方法。

6. 該蛋白質に結合活性を有する標識化合物が、式(Ia)



で表される化合物である、1に記載の方法。

7. さらに、(4)選択された被検試料が、GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するか否か、または、GPI アンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害するか否かを検定する工程、を含む、1から6のいずれかに記載の方法。

以下に、本願明細書において記載する用語、記号等の意義を説明し、本発明を詳細に説明する。

なお、本願明細書中においては、化合物の構造式が便宜上一定の異性体を表すことがあるが、本発明には化合物の構造上生ずる総ての幾何異性体、不斉炭素に基づく光学異性体、立体異性体、互変異性体等の異性体および異性体混合物を含

み、便宜上の式の記載に限定されるものではなく、いずれか一方の異性体でも混合物でもよい。従って、分子内に不斉炭素原子を有し光学活性体およびラセミ体が存在することがあり得るが、本発明においては特に限定されず、いずれの場合も含まれる。さらに結晶多形が存在することもあるが同様に限定されず、いずれかの結晶形単一または混合物であってもよく、また、無水物であっても水和物であってもどちらでもよい。

本明細書中において表される「 C_{1-6} アルキル基」とは、炭素数1ないし6個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル基を意味し、具体的には例えばメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*i*-ブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*i*-ペンチル基、ネオペンチル基、*n*-ヘキシル基、1-メチルプロピル基、1,2-ジメチルプロピル基、2-エチルプロピル基、1-メチル-2-エチルプロピル基、1-エチル-2-メチルプロピル基、1,1,2-トリメチルプロピル基、1-メチルブチル基、2-メチルブチル基、1,1-ジメチルブチル基、2,2-ジメチルブチル基、2-エチルブチル基、1,3-ジメチルブチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基等があげられる。

本明細書中において表される「 C_{2-6} アルケニル基」とは、炭素数2ないし6個の直鎖状または分枝鎖状のアルケニル基を意味し、具体的には例えばビニル基、アリル基、1-プロペニル基、イソプロペニル基、1-ブテン-1-イル基、1-ブテン-2-イル基、1-ブテン-3-イル基、2-ブテン-1-イル基、2-ブテン-2-イル基等があげられる。

本明細書中において表される「 C_{2-6} アルキニル基」とは、炭素数2ないし6個の直鎖状または分枝鎖状のアルキニル基を意味し、具体的には例えば、エチニル基、1-プロピニル基、2-プロピニル基、ブチニル基、ペンチニル基、ヘキシニル基等があげられる。

本明細書中において表される「 C_{1-6} アルコキシ基」とは前記定義の「 C_{1-6} アルキル基」が結合したオキシ基であることを意味し、具体的には、例えばメト

- 11 -

キシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、*i*-プロポキシ基、*n*-ブトキシ基、*i*-ブトキシ基、*sec*-ブトキシ基、*t*-ブトキシ基、*n*-ペンチルオキシ基、*i*-ペンチルオキシ基、*sec*-ペンチルオキシ基、*t*-ペンチルオキシ基、ネオペンチルオキシ基、1-メチルブトキシ基、2-メチルブトキシ基、1,1-ジメチルプロポキシ基、1,2-ジメチルプロポキシ基、*n*-ヘキシルオキシ基、*i*-ヘキシルオキシ基、1-メチルペンチルオキシ基、2-メチルペンチルオキシ基、3-メチルペンチルオキシ基、1,1-ジメチルブトキシ基、1,2-ジメチルブトキシ基、2,2-ジメチルブトキシ基、1,3-ジメチルブトキシ基、2,3-ジメチルブトキシ基、3,3-ジメチルブトキシ基、1-エチルブトキシ基、2-エチルブトキシ基、1,1,2-トリメチルプロポキシ基、1,2,2-トリメチルプロポキシ基、1-エチル-1-メチルプロポキシ基、1-エチル-2-メチルプロポキシ基などが挙げられる。

本明細書中において表される「 C_{6-14} アリール基」とは、炭素数6ないし14の芳香族環基をいい、具体的には例えば、フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、*as*-インダセニル基、*s*-インダセニル基、アセナフチレニル基などが挙げられる。

本明細書中において表わされる「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子を意味する。

本明細書中において表わされる「置換されていてもよい」とは、「置換可能な部位に、任意に組み合わせて1または複数個の置換基を有してもよい」と同意義であり、置換基は具体的には例えば、水素原子、ハロゲン、ニトロ基、シアノ基、ヒドロキシル基、メルカプト基、ヒドロキシアルキル基、カルボキシル基、 C_{1-6} アルコキシカルボニル基、 C_{2-7} アシルアミノ基、 C_{1-6} アルキルアミノ基、ピリジル基、 C_{1-6} アルキルスルフィニル基、 C_{1-6} アルキルスルフォニル基、 C_{1-6} アルキルスルファモイル基、 C_{1-6} アルキルスルフィナモイル基、 C_{1-6} アルキルスルフェナモイル基、テトラヒドロピラニル基、 C_{1-6} アルキルカルバモイル基、または式 $-X^4-R^{8a}$ (式中、 X^4 は、単結合、酸素原子、または硫黄原子を意味する； R^{8a} は C_{1-6} アルキ

- 12 -

ル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{3-8} シクロアルキル基、または C_{3-8} シクロアルケニル基を意味する)などが挙げられる。

本明細書中において表わされる「0ないし4個の置換基で置換されていてもよい」とは、「置換可能な部位に、任意に組み合わせて1または4個の置換基を有してもよい」と同意義であり、置換基は前記定義と同意義である。

以下に本発明に記載された、1. GWT1 遺伝子産物 (以下 GWT1 蛋白) を調製する方法、2. 標識化合物の結合実験 (以下 Binding assay) の方法、3. 式(I)に記載の化合物を合成する方法について開示する。

1. GWT1 蛋白を調製する方法

GWT1 蛋白は、真菌、好ましくは *S. cerevisiae*、*C. albicans*、*S. pombe*、*A. fumigatus*、*C. neoformans*、更に好ましくは *S. cerevisiae* の膜画分から調製する。Binding assay は、調製した膜画分をそのまま使用してもよいし、更に精製して用いてもよい。真菌に、配列番号 1、3、5、27、39、41、54または58に記載の塩基配列の DNA を導入して、GWT1 蛋白を過剰発現させることにより、Binding assay をより容易に行うことが可能であるが、本発明はこれに限られない。以下に *S. cerevisiae* の場合について具体的に説明する。

(1).GWT1 遺伝子の導入

GWT1 遺伝子は、配列番号 1、3、5、27、39、41、54または58に記載の塩基配列を基にプライマーを設計し、真菌の DNA を鋳型として PCR を行うことにより得ることができる。

GWT1 遺伝子を *S. cerevisiae* で働く発現ベクター、例えば YEp352 のマルチクローニングサイトに適当なプロモーター・ターミネーター、例えば pKT10 (Tanaka et al, Mol. Cell Biol., 10:4303-4313, 1990) 由来の GAPDH プロモーター及び GAPDH ターミネーターを挿入した発現ベクターに挿入して GWT1 発現プラスミドを作製する。*S. cerevisiae* 例えば G2-10 株を、適当な培地例えば YPD 培地 (Yeast extract-Polypeptone-Dextrose 培地) にて、適当な温度例えば 30°C で振とう培養

- 13 -

し、対数増殖後期の時点で集菌する。洗浄後、例えば酢酸リチウム法により GWT1 発現プラスミドを *S. cerevisiae* に導入する。酢酸リチウム法については YEAST MAKER™ Yeast Transformation System (Clontech 社製) User Manual に記載されている。SD(ura-)培地で 30°C、2 日間培養することにより GWT1 過剰発現株および空ベクター導入株を得ることができる。

S. cerevisiae 以外の真菌の発現ベクター及び遺伝子導入法は、*S. pombe* の発現ベクター pcL 等及びその導入法について Igarashi et al, Nature 353:80-83, 1991 に、*C. albicans* の発現ベクター pRM10 等及びその導入法について Pla J et al, Yeast, 12: 1677-1702, 1996 に、*A. fumigatus* の発現ベクター pAN7-1 等及びその導入法について Punt PJ et al, GENE, 56: 117-124, 1987 に、*C. neoformans* の発現ベクター pPM8 等及びその導入法について Monden P et al, FEMS Microbiol. Lett., 187: 41-45, 2000 に記載されている。

(2). 膜画分の調製法

GWT1 遺伝子を導入した *S. cerevisiae* を、適当な培地例えば SD(ura-)液体培地にて、適当な温度例えば 30°C で振とう培養し、対数増殖中期の時点で集菌する。菌体を洗浄した後、適量例えば菌体量の 3 倍量の Homogenization buffer (例えば 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, Complete™ (Roche 社製)) にて懸濁し、適量例えば菌体量の 4 倍量のガラスビーズを加える。これをボルテックスしては氷上に置く操作を数回繰り返して菌体を破碎する。

ここに 1 ml の Homogenization buffer を加え、遠心例えば 2,500 rpm で 5 分間遠心してガラスビーズおよび未破碎の菌体を沈殿させる。上清を別のチューブにとり、遠心例えば 135,000 rpm で 10 分間遠心することによりオルガネラを含む膜画分 (Total membrane fraction) を沈殿させる。沈殿を 1 ml の Binding buffer (例えば 0.1 M Phosphate buffer, pH 7.0, 0.05% Tween 20, Complete™ (Roche 社製)) に懸濁し、遠心例えば 2,500 rpm で 1 分間遠心することにより懸濁され

- 14 -

なかった部分を取り除き、上清を遠心例えば 15,000 rpm で 5 分間遠心する。沈殿を 150~650 μ l の Binding buffer に再懸濁して膜画分とする。

S. cerevisiae 以外の真菌の膜画分調製は、*S. pombe* については Yoko-o et al, Eur. J. Biochem. 257:630-637 (1998)に、*C. albicans* については Sentandreu M et al, J. Bacteriol., 180: 282-289, 1998 に、*A. fumigatus* については Mouyna I et al, J. Biol. Chem., 275: 14882-14889, 2000 に、*C. neoformans* については Thompson JR et al, J. Bacteriol., 181: 444-453, 1999 に記載の方法により行うことができる。

別法として GWT1 蛋白は、真菌以外の細胞、例えば哺乳類細胞、昆虫細胞、大腸菌等で発現させ、調製することができる。

哺乳類細胞では、例えば CMV プロモーターを持つ過剰発現用ベクターにつないだ GWT1 を哺乳類細胞に導入し、Petaja-Repo et al., J. Biol. Chem., 276:4416-23, 2001 に記載の方法により膜画分を調製することができる。

昆虫細胞では、例えば BAC-TO-BAC Baculovirus Expression system (GIBCO BRL 社製) 等のバキュロウイルス発現キットを用いて GWT1 発現昆虫細胞 (Sf9 細胞など) を作製し、ここから Okamoto et al., J. Biol. Chem., 276:742-751, 2001 に記載の方法により膜画分を調製することができる。

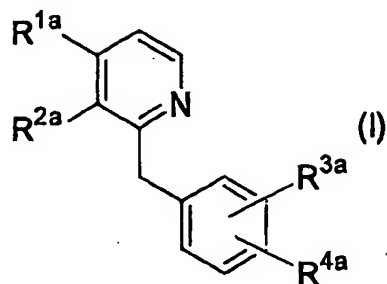
大腸菌では、例えば pGEX (Pharmacia 社製) の大腸菌発現用ベクターに GWT1 をつなぎ、BL21 などの大腸菌に導入し GWT1 蛋白を調製することができる。

2. Binding assay の方法

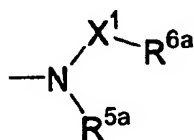
(1). 標識化合物の合成

標識化合物は、予め GWT1 蛋白と結合することが確認された化合物である。GWT1 蛋白と結合する性質を有すればいかなる化合物も許されるが、好ましくは一般式 (I)

- 15 -



[式中 R^{1a} および R^{2a} は同一または相異なってそれぞれ水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、置換されてもよい C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、置換されてもよい C_{1-6} アルコキシ基、または式



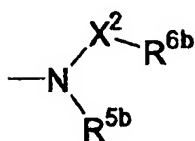
(式中 X^1 は単結合、カルボニル基、または式 $-S(O)_2-$ で表わされる基を意味する；

R^{5a} および R^{6a} は同一または相異なって、水素原子、または置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基を示す。また、 R^{1a} と R^{2a} は一緒になって、置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいピロール環、置換されていてもよいチオフェン環、置換されていてもよいフラン環、置換されていてもよいピリダジン環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいピラジン環、置換されていてもよいイミダゾール環、置換されていてもよいオキサゾール環、置換されていてもよいチアゾール環、置換されていてもよいピラゾール環、置換されていてもよいイソオキサゾール環、置換されていてもよいイソチアゾール環、置換されていてもよいシクロヘキサン環、および置換されていてもよいシクロペンタン環からなる群から選ばれる縮合環を形成してもよい；

R^{3a} 、および R^{4a} は同一または相異なってそれぞれ、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、ホルミル基、ヒドロキシイミノ

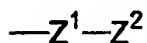
- 16 -

基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、式 $-C(O)NR^{7a}R^{7b}$ (式中、 R^{7a} および R^{7b} は同一または相異なってそれぞれ水素原子、または C_{1-6} アルキル基を意味する)、式 $-CO_2R^{7a}$ (式中、 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する)、式 $-S(O)_nR^{7a}$ (式中、 n は 0 ないし 2 の整数を意味する。 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する)、式 $-S(O)_2NR^{7a}R^{7b}$ (式中、 R^{7a} および R^{7b} は前記定義と同意義を意味する)、式



(式中 X^2 は単結合、カルボニル基、または式 $-S(O)_2-$ で表わされる基を意味する；

R^{5b} および R^{6b} は同一または相異なっていて、水素原子、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基、または置換されていてもよい C_{6-14} アリール基を意味する) で表わされる基、または式



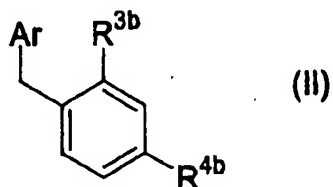
(式中、 Z^1 は単結合、酸素原子、ビニレン基、またはエチニレン基を意味する；

Z^2 は単結合、または 0 ないし 4 個の置換基で置換されてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基を意味する。 R^{3a} と R^{4a} は一緒になって、メチレンジオキシ基、または 1,2-エチレンジオキシ基を意味してもよく、また R^{3a} と R^{4a} は一緒になって、置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいピロール環、置換されていてもよいチオフェン環、置換されていてもよいフラン環、置換されていてもよいピリダジン環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいピラジン環、置換されていてもよいイミダゾール環、置換されていてもよいオキサゾール環、置換されていてもよいチアゾール環、置換されていてもよいピラゾール環、置換されていてもよいイソオキサゾール環、置換されていてもよいイソチアゾール環、置換されていてもよいシクロヘキサン環および置換されていてもよいシクロペンタン環からなる

- 17 -

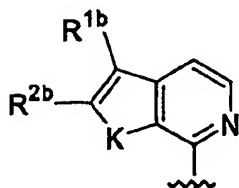
群から選ばれる縮合環の形成を意味してもよい。ただし、 R^{1a} および R^{2a} がともに水素原子を意味する場合は除く。) で示される化合物

更に好ましくは一般式(II)

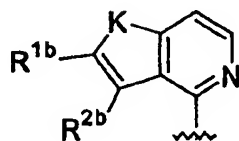


〔式中 Ar は下記式 (IIIa) - (IIIf) からなる群

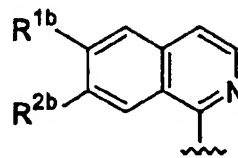
(IIIa)



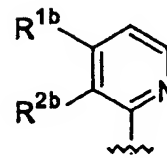
(IIIb)



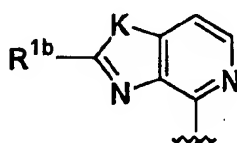
(IIIc)



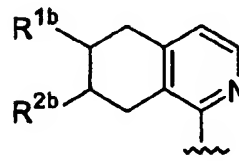
(IIId)



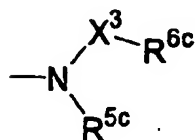
(IIIe)



(IIIf)



(式中、K は硫黄原子、酸素原子、または式 $-NH-$ で表わされる基を意味する；
 R^{1b} 、 R^{2b} は同一または相異なってそれぞれ水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基、置換されていてもよい C_{1-6} アルコキシ基、式

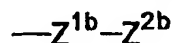


(式中 X^3 は単結合、カルボニル基、または式 $-S(O)_2-$ で表わされる基を意味する；

- 18 -

R^{5c} および R^{6c} は同一または相異なっていて、水素原子、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基、または式 $-X^4-R^{8a}$ (式中、 X^4 は、単結合、酸素原子、または硫黄原子を意味する; R^{8a} は C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、 C_{3-8} シクロアルキル基、または C_{3-8} シクロアルケニル基を意味する) で表わされる基を示す。また、 R^{1b} 、 R^{2b} は一緒になってメチレンジオキシ基、または 1,2-エチレンジオキシ基を形成してもよい。) から選ばれる置換基を意味する;

R^{3b} 、および R^{4b} は同一または相異なっていてそれぞれ、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、ホルミル基、ヒドロキシイミノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、または式、



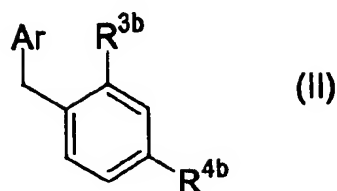
(式中、 Z^{1b} は単結合、ビニレン基、またはエチニレン基を意味する;

Z^{2b} は単結合、または 0 ないし 4 個の置換基で置換されてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基を意味する。;

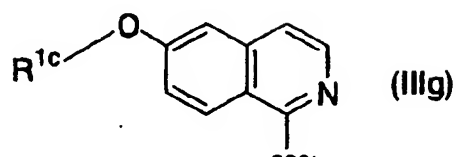
ただし (1) Ar が、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子である前記式 (IIIId) で表わされる場合、(2) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、メトキシ基、水酸基、メチル基、ベンジルオキシ基、またはハロゲン原子であり、Ar が、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子またはメトキシ基を意味する前記式 (IIIc) で表わされる場合、(3) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、水酸基、メトキシ基、またはベンジルオキシ基であり、Ar が、 R^{1b} および R^{2b} がともに水酸基またはベンジルオキシ基を意味する前記式 (IIIc) で表わされる場合、または (4) Ar が、 R^{1b} が水素原子で R^{2b} がホルミル基、ヒドロキシメチル基またはメトキシカルボニル基である前記式 (IIIId) で表わされる場合を除く。) で示される化合物、

更に好ましくは、一般式(II)

- 19 -

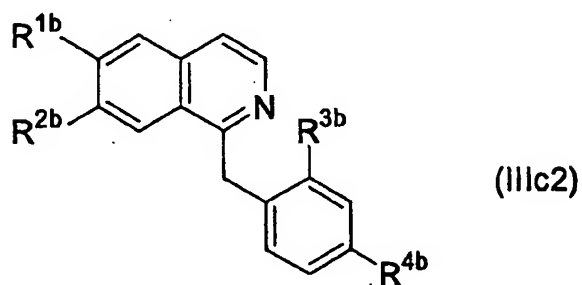


〔式中 Ar が式、



(式中、 R^{1c} が水素原子、置換されてもよい C_{1-6} アルキル基、ベンジル基を意味する。) で表わされ、かつ R^{3b} が水素原子を意味する場合を除いた〕で表される化合物、

更に好ましくは、一般式(IIIc2)

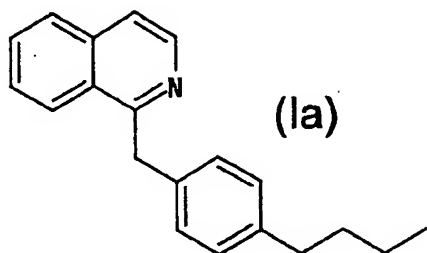


〔式中 R^{1b} 、 R^{2b} は前記定義と同意義を意味する。ただし、(1) R^{1b} が式 $R^{1c}-O-$ (式中、 R^{1c} は前記定義と同意義を意味する) で表わされる基であり、 R^{2b} が水素原子であり、 R^{3b} が水素原子を意味する場合、(2) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、メトキシ基、水酸基、メチル基、ベンジルオキシ基、またはハロゲン原子であり、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子またはメトキシ基を意味する場合、または(3) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、水酸基、メトキシ基、またはベンジルオキシ

- 20 -

基であり、 R^{1b} および R^{2b} がともに水酸基またはベンジルオキシ基を意味する場合を除く。〕で表される化合物、

更に好ましくは、式(Ia)



で表される化合物の標識化合物である。

これら化合物の中で、GWT1 蛋白質に結合活性を有する化合物が好適であり、実施例 2 に記載した *S. cerevisiae* のレポータ系で活性を示す化合物が、標識化合物としてさらに好適である。また、本発明の方法により見出された GWT1 蛋白質に結合活性を有する化合物を標識し、標識化合物として用いることも可能である。

標識の方法はいかなる方法も許されるが、好ましくは放射性標識、更に好ましくは ³H 標識であることが望ましい。放射性標識化合物は、一般製造法に述べる製造の原料として、放射性化合物を用いる、あるいは ³H 標識の場合は ³H の交換反応により合成が可能である。

(2). 特異的結合の確認

調製した膜画分に標識化合物を加え、氷上にて適当な時間例えば 1~2 時間静置して、標識化合物と膜画分との結合反応を行う。その後遠心例えば 15,000 rpm, 3 分間遠心して膜画分を沈殿させる。沈殿を Binding buffer に再度懸濁し遠心する操作を適宜(2 回)繰り返すことにより、結合していない標識化合物を除去する。沈殿を Binding buffer に懸濁し、放射能測定用バイアルに移してシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定する。

大過剰(10 倍以上)の標識していない同化合物を加えることにより、標識化合物の結合が抑制されること、GWT1 蛋白を発現させていない真菌から調製した膜画

分への結合が無視しうる程度に少ないことにより、標識化合物が GWT1 蛋白に特異的に結合していることが確かめられる。

(3). 被検化合物による標識化合物の結合阻害実験

調製した膜画分に被検化合物及び標識化合物を加え、氷上にて適当な時間例えば 1~2 時間静置して、膜画分との結合反応を行う。その後遠心例えば 15,000 rpm, 3 分間遠心して膜画分を沈殿させる。沈殿を Binding buffer に再度懸濁し遠心する操作を適宜 (2 回) 繰り返すことにより、結合していない標識化合物を除去する。沈殿を Binding buffer に懸濁し、放射能測定用バイアルに移してシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定する。

被検化合物が存在する場合に、標識化合物の膜画分への結合が抑制されれば、被検化合物が GWT1 蛋白に結合する活性があると判断される。

このような結合活性が検出された被検試料は、さらに、GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するか否か、または、GPI アンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害するか否かを検定することが好ましい。この検定の結果、被検試料が、GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害、または、GPI アンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害した場合には、該試料は、抗真菌剤の有力な候補となる。

被検試料が、GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するか否か、あるいは GPI アンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害するか否かは、(1). レポータ酵素を用いる方法、(2). 真菌細胞壁の表層糖蛋白質と反応する抗体を用いる方法、(3). 動物細胞に対する付着能により検定する方法、(4). 真菌を光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡で観察する方法により検定できる。

以下に説明する(1)~(4)の方法により、好ましくは(1)~(4)の方法を組み合わせ用いることにより、被検試料が GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害する、あるいは GPI アンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害すると判断され、しかも本件発明に記載の DNA がコードする蛋白質を、真菌に過剰発現させる

ことにより、その阻害の程度が減弱する、あるいは阻害が見られなくなる場合に、被検試料は、GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与えたと判断される。

以下、(1)～(4)の方法を説明する。

(1). レポート酵素を用いる方法

GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程は、例えば GPI アンカー蛋白質を放射性同位元素で標識し、真菌細胞壁画分を分画後、GPI アンカー蛋白質に対する抗体による免疫沈降を行うといったトレーサー実験により定量することが可能である。また、より容易には、GPI アンカー蛋白質に共通して見られ、輸送のシグナルとして働いていると考えられる C 末端配列を、測定の容易な酵素との融合蛋白質（レポート酵素）として発現させ、真菌細胞壁画分を分画後、各画分の酵素活性を測定するレポート系により定量することが可能である（Van Berkel MAA et al, FEBS Letters, 349: 135-138, 1994）。以下にレポート酵素を用いた方法について説明するが、これは本発明を限定するものではない。

先ず、レポート遺伝子を構築し真菌に導入する。レポート遺伝子は、真菌で働くプロモータ配列に続き、それぞれシグナル配列・レポート酵素・GPI アンカー蛋白質 C 末端配列をコードする DNA を、reading frame を合わせてつなぎ合わせて構築する。プロモータ配列としては、例えば GAL10、ENO1 のプロモータの配列等が挙げられる。シグナル配列としては、例えば α -ファクター、インペルターゼ、リゾチームのシグナル配列等が挙げられる。レポート酵素としては、例えば β ラクタマーゼ・リゾチーム・アルカリホスファターゼ・ β ガラクトシダーゼ等が挙げられる。酵素活性は持たないが容易に検出が可能な Green Fluorescence Protein (GFP) を用いても良い。GPI アンカー蛋白質 C 末端配列としては、例えば α -agglutinin C 末端配列・CWP2 C 末端配列等が挙げられる。また、構築したレポート遺伝子を含むベクター中に、適当な選択マーカ、例えば LEU2、URA3 等を挿入しておくことが好ましい。

構築したレポータ遺伝子を適当な方法、例えば酢酸リチウム法 (Gietz D et al, Nucl. Acids Res. 20: 1425, 1992) により真菌に導入し、必要であれば選択マーカーに適した方法、LEU2 であれば Leu⁻の培地、URA3 であれば Ura⁻の培地で培養し、DNA が導入された真菌を選択する。

被検試料が GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与えるか否かは、以下の方法により検定する。

レポータ遺伝子を導入した真菌を、被検試料の存在下、適当な条件、例えば 30℃ で 48 時間培養する。培養後、培養上清を遠心分離し、培養上清画分のレポータ酵素の活性を測定する。残された菌体画分は、洗浄後、適当な方法例えばグルカナーゼで細胞壁グルカンを分解することにより、細胞壁成分を分離し、細胞壁画分及び細胞質画分のレポータ酵素の活性を測定する。なおアッセイを簡便に行うため、遠心分離後、菌体の洗浄は行わずに、菌体画分中に残る培養上清画分由来のレポータ酵素量を比例計算により求め、菌体画分のレポータ酵素量から差し引いて菌体画分中のレポータ酵素量とすることも許される。

被検試料に、一細胞当たりの培養上清画分中のレポータ酵素活性を上昇させる、あるいは一細胞当たりの細胞壁画分中のレポータ酵素活性を低下させる活性が認められれば、該被検試料は GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与えたと判断される。

(2). 真菌細胞壁の表層糖蛋白質と反応する抗体を用いる方法

被検試料が GPI アンカー蛋白質の真菌表層での発現に影響を与えるか否かは、真菌細胞壁中の GPI アンカー蛋白質を、該蛋白質と反応する抗体によって定量することにより検出が可能である。

抗体としては、例えば GPI アンカー蛋白質例えば α -agglutinin・Cwp2p・Als1p 等のアミノ酸配列より抗原決定基を予想して (Chen MH et al, J. Biol. Chem., 270:26168-26177, 1995, Van Der Vaat JM et al, J. Bacteriol., 177:3104-3110, 1995, Hoyer LL et al, Mol. Microbiol., 15:39-54, 1995)、そ

- 24 -

の領域のペプチドを合成し、抗原性のある物質例えば異種蛋白質等に結合させて、家兎等に免疫してポリクローナル抗体を、マウス等に免疫してモノクローナル抗体を得ることが可能である。また、好ましくは、Als1p ペプチドに対する家兎ポリクローナル抗体が望ましい。

また別法として真菌、好ましくは GPI アンカー蛋白質例えば α -agglutinin・Cwp2p・Als1p 等を過剰発現させた真菌を、場合によっては更に部分精製した GPI アンカー蛋白質を、マウス等に免疫し、融合後得られたクローンを、その産生する抗体を ELISA・Western blot 解析等で選択することにより、GPI アンカー蛋白質に対するモノクローナル抗体を得ることが可能である。

被検試料が GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与え、細胞壁中の GPI アンカー由来蛋白質の量を減少させるか否かは、以下の方法により検定できる。

真菌を、被検試料の存在下、適当な条件、例えば 30°C、48 時間培養する。培養した真菌を遠心により集菌し、菌体を好ましくはガラスビーズを用いて破碎する。洗浄した破碎菌体を、好ましくは SDS で抽出遠心後、沈殿を洗浄する。抽出後の破碎菌体を、グルカンを分解する酵素、好ましくはグルカナーゼで処理し、その遠心上清を GPI アンカー蛋白質サンプルとする。

抗 Als1p ペプチド抗体を、96 well プレートに 4°C、overnight でコーティングする。洗浄液好ましくは 0.05% Tween 20 含有 PBS(PBST)で洗浄後、96 well プレートの非特異的吸着部位をブロックする試薬、好ましくは BSA・ゼラチン等の蛋白質、更に好ましくはブロックエースでブロッキングする。再度洗浄液好ましくは PBST で洗浄後、場合によっては適当に希釈した GPI アンカー蛋白質サンプルを加え、適当な時間例えば室温で 2 時間反応させる。洗浄液好ましくは PBST で洗浄後、酵素標識した *C. albicans* に対する抗体、好ましくは HRP 標識抗カンジダ抗体を、適当な時間例えば室温で 2 時間反応させる。標識の方法は酵素標識であっても、放射性同位元素による標識であっても許される。洗浄液好ましくは PBST

- 25 -

で洗浄後、標識に適した方法、酵素標識であれば基質溶液を加え、反応停止後 490 nm の吸光度を測定することにより、GPI アンカー蛋白質サンプル中の Als1p 量を算出する。

(3). 動物細胞に対する付着能により検定する方法

被検試料が GPI アンカー蛋白質の真菌表層での発現に影響を与えるか否かは、真菌細胞壁中の GPI アンカー蛋白質の活性、好ましくは真菌の動物細胞への付着能等を測定することにより、検定が可能である。GPI アンカー蛋白質の活性としては、動物細胞への付着に関与する Als1p、Hwp1 等の他に、mating に関与する α -agglutinin、酵母の凝集に関与する Flo1p 等が知られている。以下に、真菌の動物細胞への付着能により検定する方法について具体的に記載するが、本発明はこれにより限定されるものではない。

真菌としては、細胞に対する付着能を有する真菌を使用し、好ましくは真菌は *C. albicans* であることが望ましい。哺乳類細胞としては真菌が接着する性質を有する細胞を使用し、好ましくは細胞は腸管上皮細胞であることが望ましい。哺乳類細胞を培養し、適当な方法例えばエタノール固定により固定する。そこへ被検試料と適当な時間、例えば 30°C で 48 時間インキュベートした真菌を接種し、一定時間例えば 30°C で 1 時間培養後、培養上清を除去しバッファーで洗浄して寒天培地、例えばサブロー・デキストロース寒天培地 (Difco) を重層する。30°C 一晚培養後、コロニー数をカウントし、付着率を計算する。

被検試料に、化合物処理を行わなかった真菌と比較して、細胞に付着することにより形成されたコロニー数を低下させる活性が認められれば、該被検試料は GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与えたと判断される。

(4). 真菌を電子顕微鏡あるいは光学顕微鏡で観察する方法

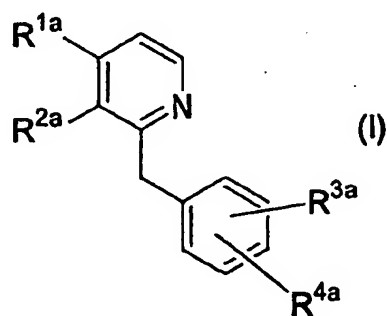
被検試料が GPI アンカー蛋白質の真菌表層での発現に影響を与えるか否かは、真菌細胞壁の構造を電子顕微鏡により観察することにより検定が可能である。

被検試料の存在下で、真菌例えば *C. albicans* を、一定時間例えば 30°C で 48 時間培養し、透過型電子顕微鏡を用いて超微形態学的構造を観察する。ここで、透過型電子顕微鏡による観察は、例えば電子顕微鏡チャートマニュアル（医学出版センター）に記載の方法により行うことができる。透過型電子顕微鏡像で見られる、電子密度の高い菌体最外層の綿状線維構造は、GPI アンカー蛋白質を構成成分とする表層糖蛋白質層であると考えられ、既存の他の抗真菌剤では影響を受けない。無処置菌体と比較し、この電子密度の高い菌体最外層の綿状線維構造が、僅かな高電子密度の層を残して消失している場合は、該被検試料が、GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与えたと判断される。

また透過型電子顕微鏡に併せ、光学顕微鏡下による観察で、真菌細胞が大きく膨化し出芽（分裂）が阻害されている像が観察される場合、該被検試料が細胞壁に対して影響を与えていると判断される。

3. 式(I)に記載の化合物を合成する方法

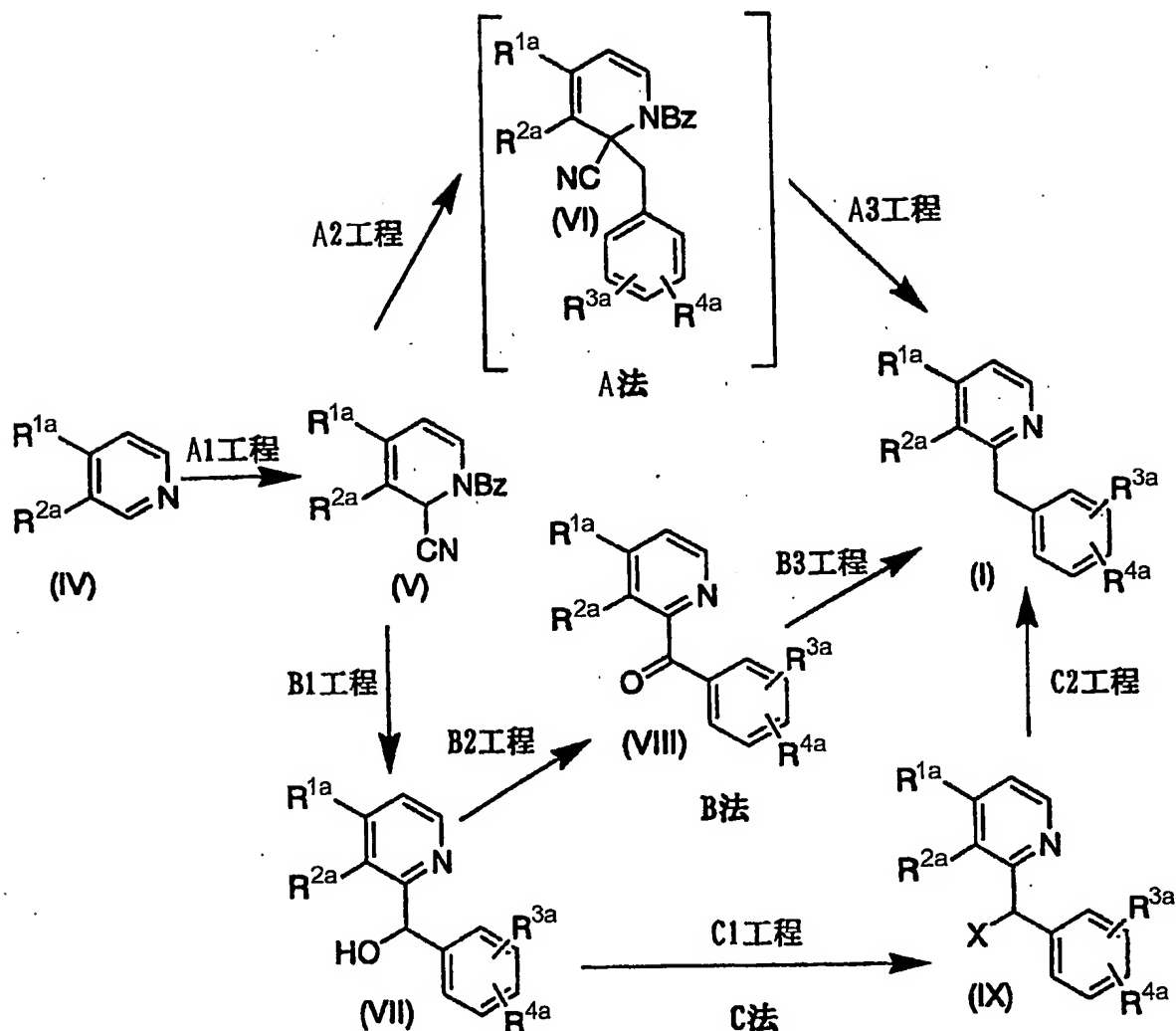
式(I)



(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)で表わされる本発明化合物は、これまでに知られている通常の有機化学反応などを利用して合成することができるが、例えば以下の方法で合成することができる。

一般製造方法 (1)

27



(式中、Xはハロゲン基、アシルオキシ基などの脱離基を表す。式中のその他の記号は前記定義と同意義を意味する。)

A1工程 ライセルト(Reissert)化合物(V)を製造する反応である。Org. Synth., VI, 115(1988)、Heterocycles, 36(11), 2489(1993)、J. Chem. Soc. (C), 666(1969)、または J. Heterocycl. Chem., 29(5), 1165(1992)などの文献に記載の反応条件に基づいて製造することができる。用いる試薬としては具体的には、例えばベンゾイルクロリドとシアン化カリウムの組み合わせの条件等があげられる。

A2工程 アルキル化の工程である。化合物(V)と置換基を有するベンジルハライド誘導体や置換基を有するベンジルメタンスルホナート誘導体などと塩基存在下反応させることにより化合物(VI)を製造することができる。塩基としては具

27/1

体的には、例えば水素化ナトリウム、水酸化ナトリウムなどを挙げることができる。

- 28 -

A3 工程 加水分解反応の工程である。化合物(VI)を塩基存在下、加水分解することにより化合物(I)を製造することができる。

A 法とは、A1 工程、A2 工程そして A3 工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

B1 工程 化合物(V)から化合物(VII)への工程である。化合物(V)と置換基を有するベンズアルデヒドを塩基と相間移動触媒の存在下、反応させることにより化合物(VII)を製造することができる。例えば、塩基としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどが挙げられる。相間移動触媒としては、トリエチルベンジルアンモニウムクロリドなどが挙げられる。

B2 工程 アルコールからケトンへの酸化の工程である。アルコールからケトンへの酸化反応で一般に用いられる酸化剤、条件を用いることによりケトン体(VIII)を製造することができる。酸化剤としては具体的には、例えば二酸化マンガ、二酸化クロムまたはベンゾキノンなどが挙げられる。

B3 工程 ケトンからメチレンへの還元工程である。ケトン体(VIII)からメチレン体(I)への還元反応で一般に用いられる還元剤の条件を用いることによりメチレン体(I)を製造することができる。例えば、還元剤としては、ヒドラジン水和物と水酸化ナトリウムあるいは水酸化カリウム、トリエチルシランとボロントリフルオライドあるいはトリフルオロメタンスルホン酸などが挙げられる。

B 法とは、A1 工程、B1 工程、B2 工程そして B3 工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

C1 工程 水酸基のハロゲン化あるいはアシル化の工程である。化合物(VII)をハロゲン化剤あるいはアシル化剤を用いて化合物(IX)を製造することができる。ハロゲン化剤としては、例えば塩化チオニル、濃塩酸、三臭化リンなどがあげられる。また、アシル化剤としては、例えばアセチルクロリドなどの酸ハライド、無水酢酸などの酸無水物などが挙げられる。

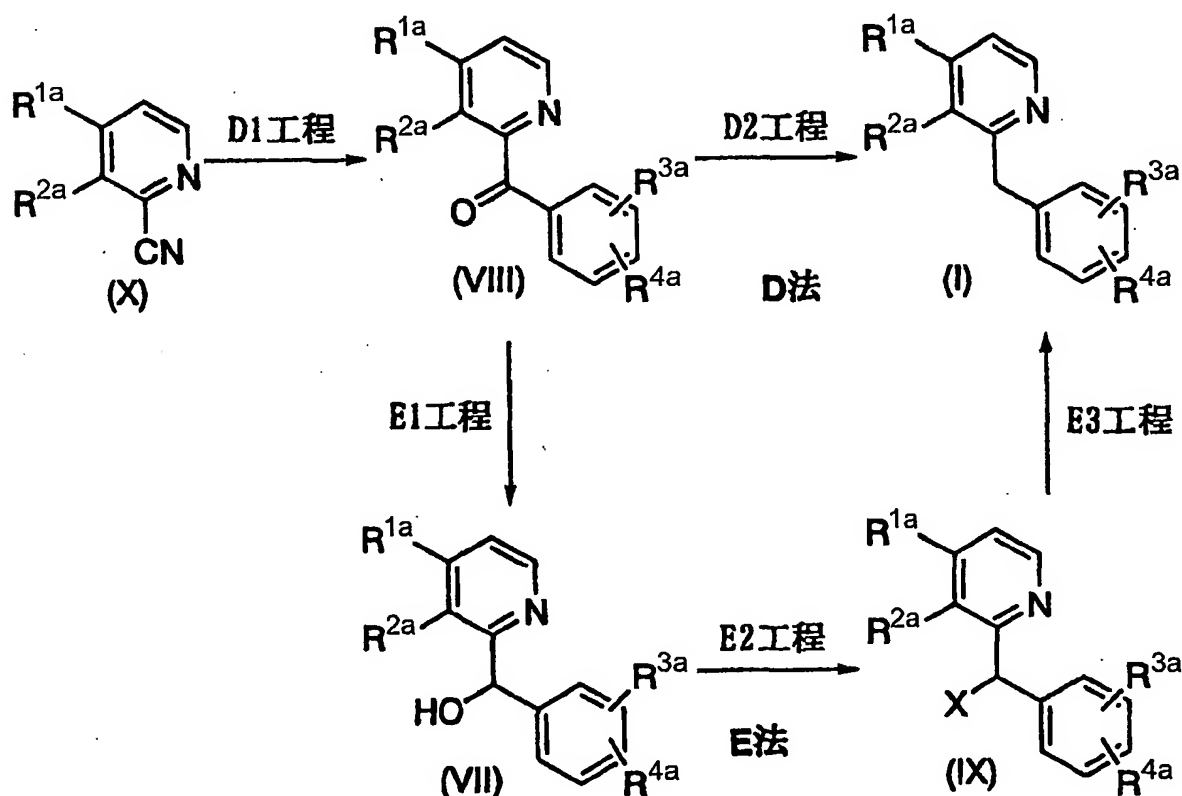
C2 工程 ハロゲン基あるいはアシルオキシ基の還元的脱離反応の工程である。化合物(IX)を触媒などを用いて水素化脱離することにより化合物(I)を製造することができる。

例えば、触媒としては、パラジウム-炭素などが挙げられる。

C 法とは、A1 工程、B1 工程、C1 工程そして C2 工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

一般製造方法 (2)

一般式(I)で表わされる本発明化合物は、以下の方法でも合成することができる。



(式中、Xはハロゲン基、アシルオキシ基などの脱離基を表す。式中のその他の記号は前記定義と同意義を意味する。)

D1 工程 グリニヤール反応とそれに続く酸加水分解反応の工程である。化合物(X)と置換基を有していてもよいフェニルグリニヤール試薬を反応させ、続いて酸存在下加水分解することにより化合物(VIII)を製造することができる。

29/1

D2 工程 B3 工程と同様な条件により、ケトン体(VIII)からメチレン体(I)を製造することができる。

- 30 -

D 法とは、D1 工程と D2 工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

E1 工程 ケトンからアルコールへの還元反応の工程である。ケトンからアルコールへの還元反応で一般に用いられる還元剤、条件を用いて化合物(VIII)から化合物(VII)を製造することができる。用いる還元剤としては具体的には、例えば水素化ホウ素ナトリウム、水素化アルミニウムリチウムなどが挙げられる。

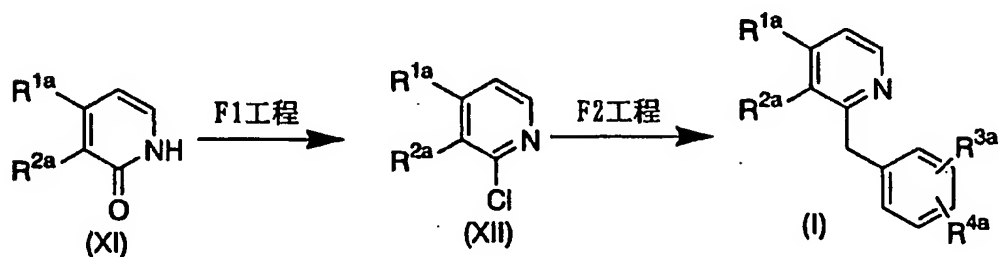
E2 工程 C1 工程と同様な条件により、アルコール体(VII)からハロゲン化あるいはアシル化体(IX)を製造することができる。

E3 工程 C2 工程と同様な還元的脱離反応の条件で、化合物(IX)から化合物(I)を製造することができる。

E 法とは、D1 工程、E1 工程、E2 工程そして E3 工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

一般製造方法 (3)

一般式(I)で表わされる本発明化合物は、以下の方法でも合成することができる。



F 法

(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

F1 工程 塩素化反応の工程である。化合物(XI)を塩素化剤を用いることにより化合物(XII)を製造することができる。塩素化剤としては、例えばオキシ塩化リン、塩化チオニルなどが挙げられる。

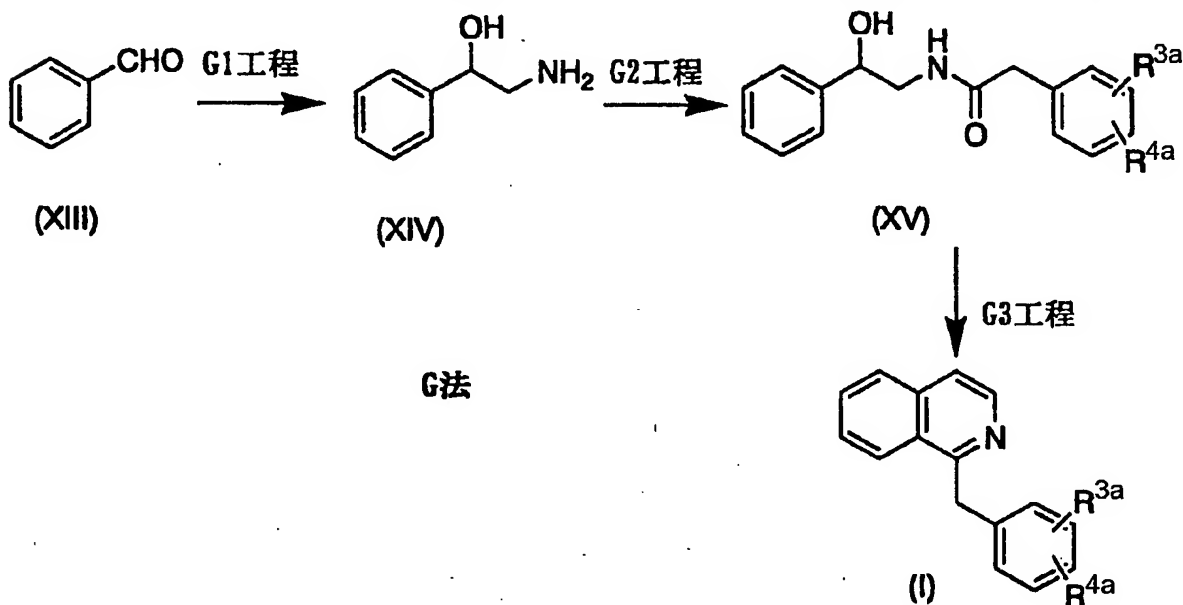
F2 工程 グリニャール試薬とのカップリング反応の工程である。Arch. Pharm., 314, 156(1981)などの文献に記載の反応条件に基づいて、化合物(XII)に置換基を

有していても良いベンジルグリニャール試薬を触媒存在下反応させることにより化合物(I)を製造することができる。触媒としては、例えば、[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロニックル(II)などが挙げられる。

F法とは、F1工程とF2工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

一般製造方法 (4)

本発明化合物、一般式(I)のうち、 R^{1a} と R^{2a} が一緒になってベンゼン環、ピリジン環、ピロール環、チオフェン環、フラン環、シクロヘキサン環、またはシクロペンタン環などの縮合環を形成する場合、以下の方法で合成することができる。



(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

製造方法の例としてイソキノリン環を形成する場合の製造方法を示す。

G1工程 縮合反応とそれに続く還元反応の工程である。置換基を有していてもよいベンズアルデヒド誘導体(XIII)とニトロメタンとの縮合反応後、ニトロ基の還元を行うことにより化合物(XIV)を製造することができる。例えば、ニトロ基の還元に行われる試薬としては、パラジウム-炭素とギ酸アンモニウム、水素化アルミニウムリチウムなどの組み合わせが挙げられる。

G2工程 アミド結合形成反応である。化合物(XIV)と置換基を有していてもよいフェニル酢酸クロリドをアミド結合生成反応に用いるカップリング試薬を用い

ることにより化合物(XV)を製造することができる。例えば、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドとN-ヒドロキシスクシンイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドとN-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1,1'-カルボニルジイミダゾールなどが挙げられる。

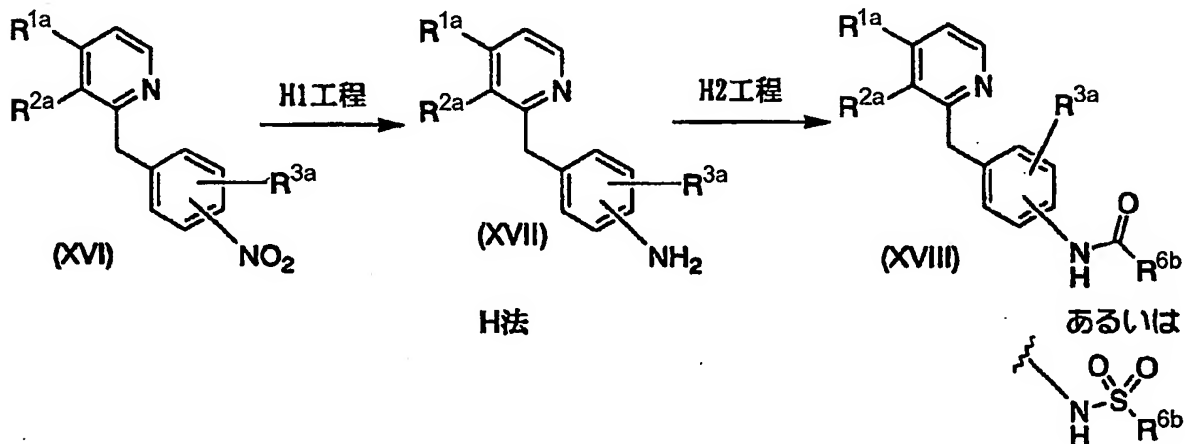
G3工程 環化反応の工程である。化合物(XV)をOrganic Reaction, 6, 74(1951)、J. Heterocyclic Chem., 30, 1581(1993)などの文献に記載の反応条件に基づいて、製造することができる。例えば、試薬としてはオキシ塩化リン、ポリリン酸などが挙げられる。

G法とは、G1工程、G2工程そしてG3工程を経由して化合物(I)を製造する方法である。

一般製造方法 (5-1)

前記の一般製造方法で合成した化合物(I)のR^{3a}、R^{4a}の置換基変換

(5-1) アミノ基、アミド基、スルホンアミド基等への置換基の変換

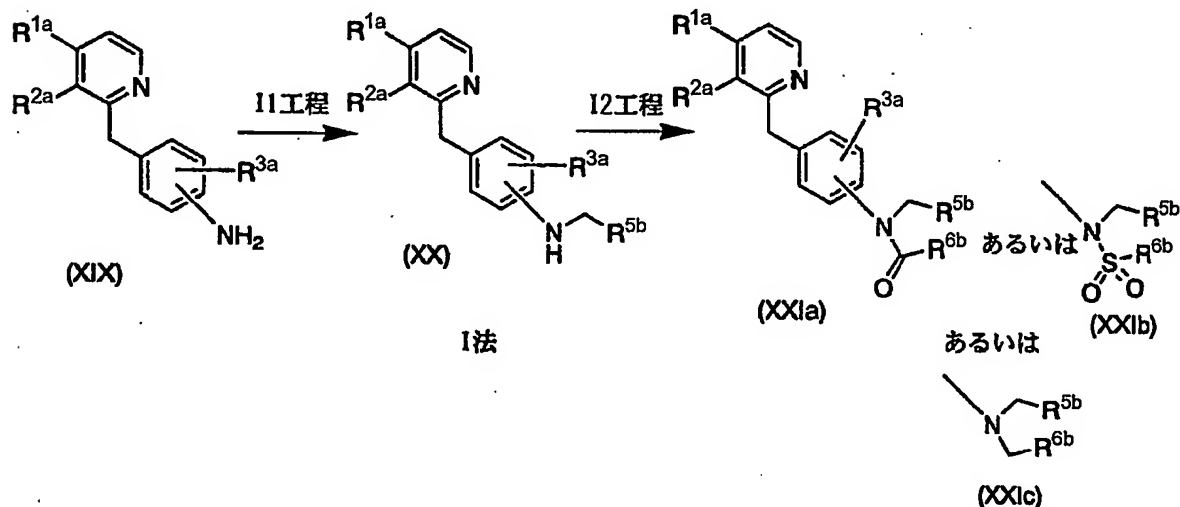


(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

H1工程 ニトロ基の還元反応である。化合物(XVI)を一般的に利用されるニトロ基の還元法で還元することにより化合物(XVII)を製造することができる。例えば、ニトロ基の還元法としては、パラジウム-炭素、水酸化パラジウムによる接触水素化還元、鉄-塩化アンモニウム、鉄-塩酸、鉄-酢酸などによる還元が挙げられる。

H2 工程 アシル化あるいはスルフォニル化反応の工程である。化合物 (XVII) を酸クロリドあるいは酸無水物を用いることにより化合物 (XVIII) を製造することができる。

H 法とは、H1 工程と H2 工程を経由して化合物 (XVIII) を製造する方法である。



(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

I1 工程 還元的アミノ化反応の工程である。化合物 (XIX) と置換基を有していても良いアルデヒドを J. Am. Chem. Soc., 93, 2897(1971)、Comprehensive Organic Synthese, 8, 25(1991)、Tetrahedron, 40, 1783(1984)そして Tetrahedron, 41, 5307(1985)などの文献に記載の反応条件に基づいて、化合物 (XX) を製造することができる。例えば、還元的アミノ化試薬としては、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、シアン水素化ホウ素ナトリウム、ボラン-ピリジン錯体、パラジウム-炭素/水素等が挙げられる。

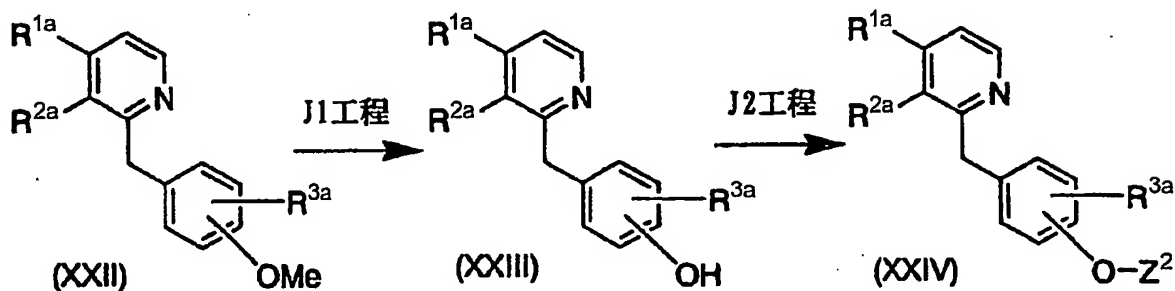
I2 工程 アシル化、スルフォニル化あるいは還元的アミノ化反応の工程である。化合物 (XX) を酸クロリドあるいは酸無水物を用いることにより化合物 (XXIa) あるいは化合物 (XXIb) を製造することができる。または、還元的アミノ化反応を I1 工程と同様に行うことにより化合物 (XXIc) を製造することができる。

I 法とは、I1 工程と I2 工程を経由することにより化合物 (XXIa)、化合物 (XXIb) あるいは化合物 (XXIc) を製造する方法である。

一般製造方法 (5-2)

前記の一般製造方法で合成した化合物(I)の R^{3a} 、 R^{4a} の置換基変換

(5-2) 水酸基、アルコキシ基等への置換基の変換

**J法**

(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

J1工程 脱メチル化反応で、Bull. Chem. Soc. Jpn., 44, 1986(1971)、Org. Synth., Collect. Vol. V, 412(1073)、J. Am. Chem. Soc., 78, 1380(1956)、または J. Org. Chem., 42, 2761(1977)などの文献に記載の反応条件に基づいて、化合物(XXII)から化合物(XXIII)を製造することができる。例えば、脱メチル化反応に使用される試薬としては、47%臭化水素酸水溶液、ボロントリプロミド、ピリジン塩酸塩そしてヨードトリメチルシランなどが挙げられる。

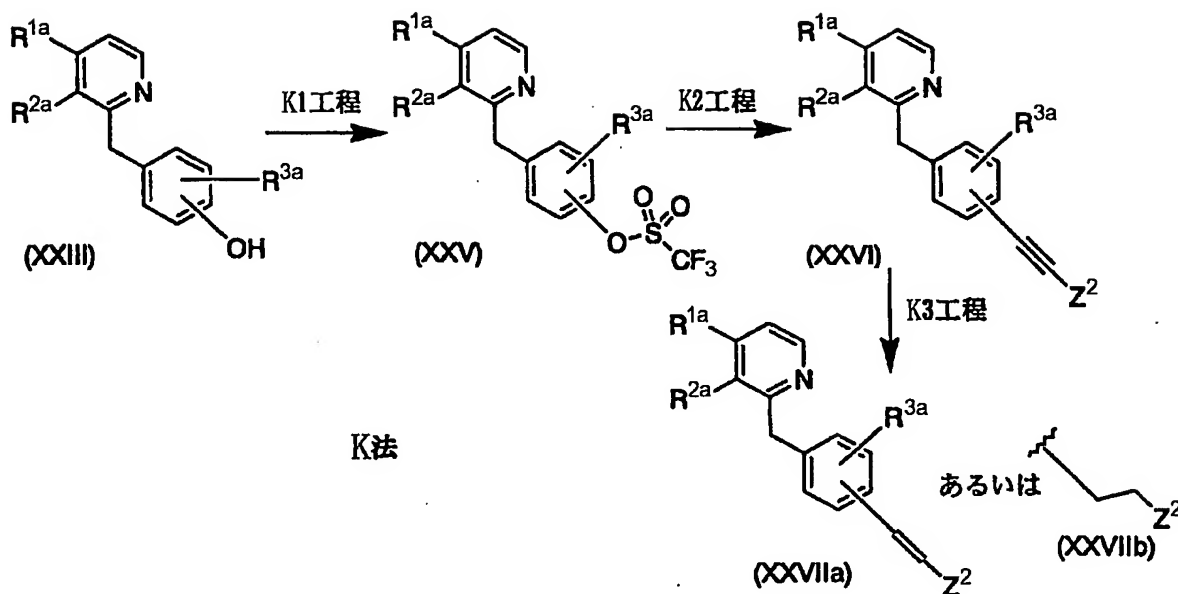
J2工程 アルキル化反応の工程である。化合物(XXIII)を塩基存在下置換基されていても良いアルキルハライドあるいは置換基されていてもよいアルキルメタンスルフォネートなどと反応させることにより化合物(XXIV)を製造することができる。

J法とは、J1工程とJ2工程を経由して化合物(XXIV)を製造する方法である。

一般製造方法 (5-3)

前記の一般製造方法で合成した化合物(I)の R^{3a} 、 R^{4a} の置換基変換

(5-3) ビニレン基またはエチニレン基、アルキル基等への置換基の変換



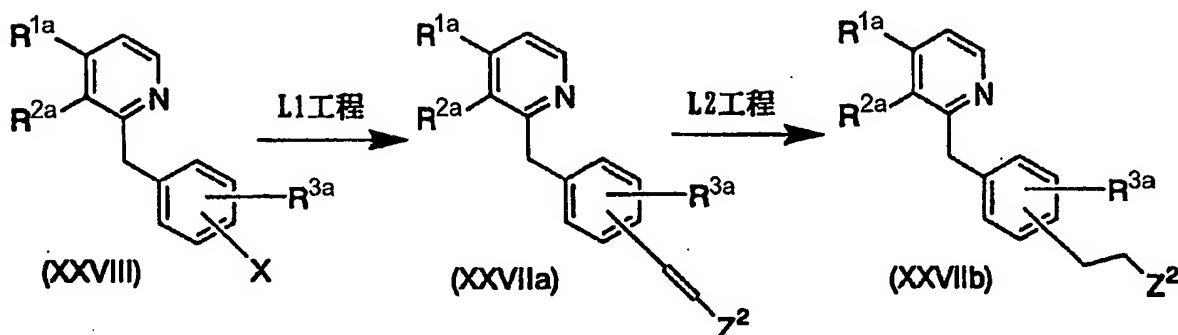
(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

K1 工程 トリフラート化反応の工程である。化合物(XXIII)を塩基存在下トリフルオロメタンスルホン酸無水物と反応させることにより化合物(XXV)を製造することができる。

K2 工程 アルキンとのカップリング反応の工程である。化合物(XXV)とアルキン誘導体をパラジウムのホスフィン錯体、ヨウ化銅そして塩基存在下、カップリングすることにより化合物(XXVI)を製造することができる。例えば、パラジウムのホスフィン錯体を系中で生成させる試薬としては、パラジウム-炭素とトリフェニルホスフィン、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)とトリフェニルホスフィン、ジクロロビストリフェニルホスフィンパラジウム(II)、酢酸パラジウム(II)とトリ(o-トリル)ホスフィン、酢酸パラジウム(II)と1,1'-ビス(ジフェニルフォスフィノ)フェロセンなどが挙げられる。塩基としては、トリエチルアミン、ピペリジン、ピリジン、炭酸カリウムなどが挙げられる。反応により塩化リチウムを使用することがある。

K3 工程 不飽和炭化水素の還元反応の工程である。化合物(XXVI)を触媒を用いた接触水素化還元などにより化合物(XXVIIa)あるいは化合物(XXVIIb)を製造する

方法である。例えば、触媒として用いられるものとしてはパラジウム-炭素、水酸化パラジウム、酸化白金、パラジウム-炭素-炭酸カルシウムなどが挙げられる。



X はハロゲン原子、トリフルオロスルホネートなどの脱離基を表す。

L法

(式中の記号は前記定義に同意義を意味する。)

L1 工程 アルケンとのカップリング反応 (ヘック (Heck) 反応) の工程である。
 J. Org. Chem., 37, 2320 (1972)、Org. Reactions., 27, 345 (1982)、Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, 833 (1991)、Palladium Reagents and Catalysts, 125 (1995)、Chem. Commun., 1287 (1984)、Tetrahedron Lett, 26, 2667 (1985) そして Tetrahedron Lett, 31, 2463 (1990) などの文献に記載の反応条件に基づいて、触媒 (パラジウム錯体と配位子など) を用いて、化合物 (XXVIII) から化合物 (XXVIIa) を製造することができる。この反応に用いる触媒 (パラジウム錯体と配位子) の組み合わせとしては、例えば酢酸パラジウム(II)と1,1'-ビス(ジフェニルフォスフィノ)フェロセン、酢酸パラジウム(II)とトリ(o-トリル)フォスフィンなどが挙げられる。用いられる3級塩基としてはトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミンそして1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセンなどが挙げられる。化合物 (XXVIII) の X は脱離基を意味し、例えばハロゲン基、トリフルオロメタンスルフォニルオキシ基などを挙げることができる。

L2 工程 K3 工程と同様な不飽和炭化水素の還元反応の条件により、化合物 (XXVIIa) から化合物 (XXVIIb) を製造することができる。

L 法とは、L1 工程により化合物 (XXVIIa)、続いて L2 工程により化合物 (XXVIIb) を製造する方法である。

本発明にかかる前記式 (I) で表わされる化合物について得られる種々の異性体は、通常分離手段 (例えば再結晶、クロマトグラフィー等) を用いることにより精製し、単離することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程の模式図である。GPI アンカー蛋白質は、一旦、細胞膜にアンカーした後、細胞壁に輸送される。

図 2 は、*S. cerevisiae* レポータ系での前記式 (I a) に記載の化合物の活性を示すグラフである。前記式 (I a) に記載の化合物の存在下では、0.39~1.56 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で培養上清画分中のセファロスポリナーゼ活性が上昇、細胞壁画分中の活性が低下し、3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で増殖抑制が見られた。

図 3 は、*C. albicans* の動物細胞付着への前記式 (I a) に記載の化合物の影響を示すグラフである。増殖抑制の見られない 1.56 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でも、*C. albicans* の動物細胞への付着が半分程度にまで抑制された。

図 4 は、*C. albicans* の Als1p 抗原量への前記式 (I a) に記載の化合物の影響を示すグラフである。前記式 (I a) に記載の化合物の存在下では、0.1~0.39 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、培養上清画分中の Als1p 抗原量が上昇し、細胞壁画分中の抗原量が低下した。

図 5 は、*C. albicans* 遺伝子の GWT1 遺伝子をプローブとしたサザンブロット解析を示す図である。EcoRI で 6.5 kb、HindIII で 4.0 kb、EcoRI-HindIII で 2.0 kb、EcoRI-PstI で 2.5 kb の単一のバンドが観察され、*C. albicans* の前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性遺伝子のホモログは、単一の遺伝子として存在することが予想された。

図 6 は、GWT1 遺伝子産物を過剰発現した *S. cerevisiae* における前記式 (I a) に記載の化合物の活性を示すグラフである。*S. cerevisiae* CW63 株 (図中の「W/T」) では、培養上清画分中のセファロスポリナーゼ活性が上昇し、細胞壁画分中の活性が低下している前記式 (I a) に記載の化合物濃度 ($0.39 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$) でも、*S. cerevisiae* CW63/GWT1 株では影響が見られず、また *S. cerevisiae* CW63 株では増殖が抑制される前記式 (I a) に記載の化合物濃度 ($> 3.13 \mu\text{g/ml}$) でも、*S. cerevisiae* CW63/GWT1 株 (図中の「O/E」) では増殖抑制が見られなかった。

図 7 は、*S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans* の GWT1 遺伝子のコードする蛋白において高度に保存されている領域を整列させた図である。

図 8 は、GWT1 蛋白を発現した膜画分への標識化合物 1 (化合物リストの 1 に記載の化合物 ; 1- (4-ブチルベンジル) イソキノリン) の特異的結合の図である。

図 9 は、被検化合物による標識化合物 1 の *S. cerevisiae* GWT1 遺伝子産物を発現した膜画分への結合に対する阻害の図である。

図 10 は、*Candida albicans* GWT1 遺伝子産物に対する化合物 1 の結合を検出した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

実施例 1 レポータ遺伝子の構築と *S. cerevisiae* への導入

(1). リゾチームをレポータ酵素とするレポータ遺伝子の構築

EN01 プロモーター＋分泌シグナル＋リゾチーム遺伝子を含むプラスミド pESH (Ichikawa K et al, Biosci. Biotech. Biochem., 57(10), 1686-1690, 1993) を鋳型に、配列番号 8 及び配列番号 9 に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、プロモータ配列を含むリゾチーム遺伝子を PCR により増幅し、pCR-Script

- 39 -

SK(+)*SalI*-*EcoRI* site にサブクローニングした(a)。また、*S. cerevisiae* 染色体 DNA を鋳型に、配列番号 10 及び配列番号 11 に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして CWP2 遺伝子を PCR 増幅し、pUC19 の *EcoRI*-*HindIII* site にサブクローニングした(b)。同様に、pYES2 (INVITROGEN) を鋳型に、配列番号 12 及び配列番号 13 に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてして CYC1 ターミネーターを PCR 増幅し、pUC19 の新たに導入した *NotI*-*KpnI* site にサブクローニングした(c)。

次に、pESH の *SalI*-*HindIII* 切断部分に *SalI*-*EcoRI* で切り出したリゾチーム遺伝子(a)および *EcoRI*-*HindIII* で切り出した CWP2 遺伝子(b)を挿入した。最後に、EN01 プロモーター＋分泌シグナル＋リゾチーム遺伝子＋CWP2 遺伝子を含む遺伝子を *BamHI*-*HindIII* で切り出し、インテグレーション用ベクター pRS306(Sikorski RS et al, Genetics. 122(1):19-27, 1989) に挿入後、*HindIII*-*KpnI* 切断部分に *HindIII*-*KpnI* で切り出した CYC1 ターミネーター(c)を挿入し、pRLW63T を作製した。

(2). セファロスポリナーゼをレポータ酵素とするレポータ遺伝子の構築

上述の pESH を鋳型にして、配列番号 14 及び配列番号 15 に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、プロモータ配列・分泌シグナル部分を含む DNA を PCR により増幅し、pUC19 の新たに導入した *BamHI*-*NotI* site にサブクローニングした(d)。また、*Citrobacter freundii* 染色体 DNA を鋳型にし、配列番号 16 及び配列番号 17 に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、セファロスポリナーゼ遺伝子を PCR 増幅し、pUC19 の新たに導入した *NspV*-*XbaI* site にサブクローニングした(e)。同様に *S. cerevisiae* 染色体 DNA を鋳型にし、配列番号 18 及び配列番号 19 に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、CWP2 遺伝子 PCR 増幅し、pUC19 の *XbaI*-*HindIII* site にサブクローニングした(f)。

(d)を挿入したプラスミドの *BamHI*-*SalI* 切断部分に pESH の *BamHI*-*SalI* 断片を挿入し、EN01 プロモーター全長＋分泌シグナル部分を作製後、*NspV*-*HindIII* 切断

- 40 -

部分に NspV-XbaI で切り出したセファロスポリナーゼ遺伝子および XbaI-HindIII で切り出した CWP2 遺伝子を挿入した。次いで、EcoRI-HindIII で切り出し、上述の pRS306 に挿入後、HindIII-KpnI 切断部分に CYC1 ターミネーターを挿入して、pRCW63T を作製した。

(3). レポータ遺伝子の *S. cerevisiae* への導入

S. cerevisiae G2-10 株を、10 ml の YPD 培地にて 30°C で振とう培養し、対数増殖後期 ($2 \sim 5 \times 10^7$ cells/ml) の時点で集菌した。滅菌水で洗浄後、YEASTMAKER™ Yeast Transformation System (Clontech) を用いた酢酸リチウム法 (YEASTMAKER™ Yeast Transformation System User Manual に記載) によって上述した pRLW63T および pRCW63T を導入した。pRLW63T は EcoRV で、pRCW63T は ApaI で URA3 遺伝子を切断したものをを用いた。SD(Ura⁻) 培地で 30°C、3 日間培養後、増殖したコロニーを YPD 培地で培養した。

リゾチームおよびセファロスポリナーゼ活性の局在を確認したところ、両活性共に主として細胞壁に局在し、CWP2 の C 端配列が細胞壁への輸送シグナルとして働いていることが確認された。

実施例 2 *S. cerevisiae* レポータ系による薬剤のスクリーニング

リゾチームと比較して、セファロスポリナーゼの方が酵素反応の感度が良いことから、化合物のスクリーニングには、pRCW63T を導入した *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* CW63 株) を用いた。

YPD 液体培地に 30°C、48 時間静置培養後、YPD 液体培地で 100 倍希釈した菌液 ($3 \sim 5 \times 10^5$ cells/ml) 75 μ l/well を、被検試料希釈液 25 μ l/well が入った V 底 96 well プレートに接種し、30°C で 48 時間静置培養した。プレートを遠心後、上清 25 μ l を 96 well 平底プレートにサンプリングし、培養上清画分とした。

沈殿した菌を懸濁し、2.4M ソルビトールで調整したザイモリエース (生化学工業) 溶液 75 μ l/well を加え、30°C、1 時間作用させた。プレートを遠心後、上清

- 41 -

10 μ l を 96 well 平底プレートにサンプリングし、15 μ l のリン酸バッファーを加え、細胞壁画分とした。

プールしたサンプルに 200 μ M ニトロセフィン溶液を加え、一定時間後にクエン酸バッファーで反応停止後、490 nm の吸光度を測定することにより、培地および細胞壁画分中のセファロスポリナーゼ活性を測定した。

また、被検試料存在下での菌の増殖は、肉眼による観察で判定した。

図 2 には、前記式 (I a) に記載の化合物の存在下では、0.39~1.56 μ g/ml の濃度で培養上清画分中のセファロスポリナーゼ活性が上昇し、細胞壁画分中の活性が低下することを示した。この様に、培養上清画分中のセファロスポリナーゼ活性を上昇させ、かつ細胞壁画分中のセファロスポリナーゼ活性を減少させる化合物を、GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害する化合物とした。

実施例 3 カンジダの動物細胞への付着を指標とした薬剤のスクリーニング

6 穴マルチウェルプレートの各穴に、10%牛胎児血清および 2 mM グルタミンを含む D-MEM 培地（日水製薬）で 1×10^5 個/ml に調整した IEC-18 細胞を、3 ml ずつ分注した。該プレートを炭酸ガスインキュベータ内で 37°C、3 日間培養後、培養上清を除去し、エタノール固定した。

各濃度の被検試料を含有したサブロー・デキストロース液体培地で 30°C・48 時間培養した *C. albicans* を 4×10^2 個/ml に調整し、固定した IEC-18 細胞を培養したプレートの各穴に、1 ml 接種した。30°C・1 時間培養後、培養上清を除去し、PBS で洗浄後、サブロー・デキストロース寒天培地 (Difco) を 2 ml 重層した。30°C、一夜培養後、増殖してきたコロニー数 (CFU) をカウントし、付着率を算出した。

図 3 には前記式 (I a) に記載の化合物で、増殖抑制の見られない 1.56 μ g/ml の濃度でも、*C. albicans* の動物細胞への付着が半分程度にまで抑制されたこと

を示した。処理しない *C.albicans* と比較して、細胞に付着した CFU を減少させた被検試料を、*C.albicans* の動物細胞への付着を抑制する化合物とした。

実施例 4 ELISA による GPI アンカー蛋白質の定量値を指標とした薬剤のスクリーニング

(1). 抗 Als1p ペプチド抗体の作製

配列番号 20 に記載の合成ペプチドを KLH とコンジュゲートし、家兎に免疫した。得られた抗血清をアフィニティ精製し、IgG 画分を抗 Als1p ペプチド抗体とした。

(2). 抗 Als1p ペプチド抗体を用いた ELISA による薬剤のスクリーニング

C. albicans を、各濃度の被検薬剤を含有したサブロー・デキストロース液体培地中 (5 ml) で 30°C・48 時間培養し、遠心による集菌、洗浄後、300 μ l のトリス塩酸バッファーに懸濁した。懸濁した菌体を、ガラスビーズを入れたマイクロチューブに移し、1 分間の攪拌、1 分間の氷冷を 10 回繰り返すことにより破碎した。洗浄した破碎菌体を 2% SDS で 95°C・10 分間抽出し、遠心後、沈殿をリン酸バッファーで 5 回洗浄した。その沈殿に 5 μ g/ml のザイモリエース溶液 0.5 ml を加え 37°C・1 時間反応後、その遠心上清を GPI アンカー蛋白質サンプルとした。

50 μ l の抗 Als1p ペプチド抗体 (40 μ g/ml) を、96 well プレートに 4°C・overnight コーティングした。0.05% Tween 20 含有 PBS (PBST) で 5 回洗浄後、25% ブロックエースで室温、2 時間ブロッキングした。PBST で 3 回洗浄後、2 倍階段希釈した GPI アンカー蛋白質サンプル 50 μ l を室温、2 時間反応させた。PBST で 5 回洗浄後、1000 倍希釈した HRP 標識抗カンジダ抗体 (ViroStat) 100 μ l を室温、2 時間反応させ、PBST で 5 回洗浄後、基質溶液 75 μ l を加えた。反応停止後、490 nm の吸光度を測定した。

図 4 には、前記式 (I a) に記載の化合物の存在下では、0.1~0.39 μ g/ml の濃度で、培養上清画分中の Als1p 抗原量が上昇し、細胞壁画分中の抗原量が低下

していることを示した。この様に、化合物で処理しない *C. albicans* と比較して、ELISA で定量した培養上清画分中の Als1p 量を上昇させ、あるいは胞壁画分中の Als1p 量を減少させた化合物を、*C. albicans* の GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害する化合物とした。

実施例 5 被検試料の存在下で培養した *C. albicans* 細胞壁の電子顕微鏡による観察

各濃度の被検薬剤を含有したサブロー・デキストロース液体培地中 (5 ml) で 30°C・48 時間培養後、遠心、集菌した *C. albicans* を過マンガン酸カリ固定法により固定し、透過型電子顕微鏡像を観察した。

菌体最外層に電子密度の高い綿状線維構造が観察され、GPI アンカー蛋白質を構成成分とする表層糖蛋白質層であると考えられた。この綿状線維構造は既存の他の抗真菌剤では影響を受けなかった。

前記式 (I a) に記載の化合物の存在下で培養した *C. albicans* は、無処置菌体と比較し、電子密度の高い菌体最外層の綿状線維構造が、僅かな高電子密度の層を残して消失していた。この様に、電子密度の高い菌体最外層の綿状線維構造が消失している場合に、被検試料を GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程に影響を与える化合物とした。

実施例 6 *S. cerevisiae* の前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性遺伝子のスクリーニング

S. cerevisiae 遺伝子のプラスミドライブラリーは、ATCC (Information for ATCC Number: 37323) から入手した。

S. cerevisiae G2-10 株を、10 ml の YPD 培地にて 30°C で振とう培養し、対数増殖後期 ($1 \sim 2 \times 10^7$ cells/ml) の時点で集菌した。滅菌水で洗浄後、YEASTMAKERTM Yeast Transformation System (Clontech) を用いた酢酸リチウム法 (YEASTMAKERTM

- 44 -

Yeast Transformation System User Manual に記載) によって、*S. cerevisiae* 遺伝子のプラスミドライブラリーを導入し、SD (Leu-) プレート上に撒いて、約 80000 個のコロニーを得た。コロニーを回収・希釈し、前記式 (I a) に記載の化合物を $1.56 \mu\text{g/ml}$ 及び $3.125 \mu\text{g/ml}$ の濃度で含む SD (Leu-) プレートに、プレート当たり 57 万コロニーになるように撒いた。その後、 37°C で 72 時間インキュベートして耐性クローンを獲得した。

27 個のクローンをピックアップし、METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 194: 169-182 (1991) に記載の方法によりプラスミドを回収して、インサートを解析したところ、27 個全てが同一のフラグメントを含んでいた。

ABI377 system (PE applied Biosystems 社製) を用いて塩基配列を決定した結果、配列番号 1 に記載の DNA が、前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性を付与する DNA であることが明らかとなり GWT1 と命名した。

実施例 7 *S. cerevisiae* GWT1 遺伝子の、*C. albicans* ホモログのサザンブロット解析

$25 \mu\text{g}$ の *C. albicans* ゲノム DNA を、EcoRI (TaKaRa)、HindIII (TaKaRa)、BamHI (TOYOBO)、PstI (New England Biolabs) (2 種類の酵素の組み合わせも含む) で 16 時間処理後、エタノール沈殿により濃縮し、 $25 \mu\text{l}$ の滅菌水に溶解してサンプルとした。制限酵素消化した $25 \mu\text{g}$ の genome DNA を、0.75% アガロースゲル電気泳動法により分離し、ナイロンメンブレン (GeneScreen PLUS /NEN) へトランスファーした。

プローブは、配列番号 1 に記載の約 1.5 kb の DNA フラグメント 20 ng を、ランダムプライマー法により $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP でラベルし、GeneQuant カラム (Amersham-Pharmacia) を用いて精製し作製した。

ハイブリダイゼーションは、メンブレンを、10 ml の PerfectHyb™ (TOYOBO) 溶液に浸し 65°C で 1 時間ブレインキュベーションをおこなった後、ラベルした上

- 45 -

記プローブを添加し、65°Cで更に2.5時間インキュベーションした。洗浄は、1).2xSSC, 0.05% SDS 溶液: 25°C5分、2).2xSSC, 0.05% SDS 溶液: 25°C15分、3).0.1xSSC, 0.1% SDS 溶液 50°C20分で行った。洗浄後のメンブレンをサララップで包み、Imaging Plate (FUJI) と室温で12時間接触させ、Imaging Plate に転写されたイメージをBAS2000 (FUJI) を用いて取り込み、画像解析をおこなった。

その結果、EcoRI で6.5 kb、HindIII で4.0 kb、EcoRI-HindIII で2.0 kb、EcoRI-PstI で2.5 kbの単一のバンドが観察され(図5)、*C. albicans* の前記式(I a)に記載の化合物に対する耐性遺伝子のホモログは、単一の遺伝子として存在することが予想された。

実施例8 *C. albicans* の前記式(I a)に記載の化合物に対する耐性遺伝子のスクリーニング

C. albicans のゲノムライブラリーは、Navaro-Garcia F et al, Mol. Cell. Biol., 15: 2197-2206, 1995に記載の方法により作製した。具体的には、*C. albicans* のゲノムDNAをSau3AIで部分消化した後、3~5 kb前後のDNAフラグメントを回収し、YEp352シャトルベクターのBamHIサイトに挿入した。

S. cerevisiae G2-10株を、10 mlのYPD培地にて30°Cで振とう培養し、対数増殖後期($2 \sim 5 \times 10^7$ cells/ml)の時点で集菌した。滅菌水で洗浄後、YEASTMAKER™ Yeast Transformation System(Clontech)を用いた酢酸リチウム法(YEASTMAKER™ Yeast Transformation System User Manualに記載)によって、*C. albicans* のゲノムライブラリーを導入し、SD(Ura⁻)プレート上に撒いて、約25000個のコロニーを得た。コロニーを回収・希釈し、前記式(I a)に記載の化合物を1.56 µg/mlの濃度で含むSDプレートに、プレート当たり50万コロニーになるように撒いた。その後、30°Cで6時間、37°Cへ移して66時間インキュベートして耐性クローンを獲得した。

- 46 -

30 個のクローンをピックアップし、METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 194: 169-182 (1991)に記載の方法によりプラスミドを回収して、インサートを解析したところ、30 個のうち 28 個が同一のフラグメントを含んでいた。

ABI377 system (PE applied Biosystems 社製) を用いて、塩基配列を決定した結果、配列番号 3 に記載の DNA が、前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性を付与する DNA であることが明らかとなった。

実施例 9 *C. albicans* 臨床分離株からの前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性遺伝子ホモログのクローニング

発明者らが保存する *C. albicans* 臨床分離株より精製した、ゲノム DNA を鋳型とし、配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 をプライマーとして PCR による増幅を行った。独立した 3 本の PCR サンプルから、いずれも約 1.6 kb の DNA フラグメントが増幅され、増幅されたフラグメントを精製し、pT7-Blue ベクター (Novagen) にサブクローニングして塩基配列を決定したところ、配列番号 5 に示す DNA 配列が見いだされた。実施例 7 に記載の DNA (配列番号 3) との間で 3 箇所の配列が異なっていた。

また、Stanford 大の sequence センター (<http://sequence-www.stanford.edu/>) で決定された *C. albicans* 遺伝子塩基配列中にも、実施例 7 に記載の DNA のホモログが見出され (配列番号 7)、実施例 7 に記載の DNA (配列番号 3) との間で 4 箇所の配列が異なっていた。

実施例 10 GWT1 遺伝子産物を過剰発現した *S. cerevisiae* の作製

実施例 6 で得られた前記式 (I a) に記載の化合物に対する耐性クローンより精製したプラスミドを鋳型とし、配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 をプライマーとして、PCR 増幅を行った。PvuII で切断した PCR 産物を、実施例 1 で作製した pRLW63T の SalI-HindIII 切断部分に挿入した。BamHI-KpnI でインサート全体を切り出し、

pRS304(Sikorski RS et al, Genetics. 122(1): 19-27, 1989)のMCS(multi-cloning site)に挿入し、インテグレーション用ベクターを作製した。

セファロスポリナーゼ遺伝子をレポータ遺伝子として持つ、*S. cerevisiae* CW63株を実施例1に記載の方法で培養し、インテグレーション用ベクターのTRP1をEcoRVで切断後、実施例1に記載の方法で形質転換した。SD(Trp⁻)培地で30℃、3日間培養することによりGWT1過剰発現株を得た(*S. cerevisiae* CW63/GWT1株)。

GWT1 過剰発現株は、前記式(I a)に記載の化合物に対して耐性を示す以外に、野生株との差異は見られず、他の抗真菌剤シクロヘキシミド、ベノミル、アンホテリシンBに対して感受性であった。

実施例 1 1 GWT1 遺伝子を欠失した *S. cerevisiae* の作製

S. pombe の his5 遺伝子 (Longtine MS et al, Yeast, 14: 953-961, 1998) を鋳型とし、配列番号 2 5 及び配列番号 2 6 をプライマーとして、両端に GWT1 配列を含む his5 カセットを PCR で増幅した。

S. cerevisiae G2-10 を実施例 1 に記載の方法で培養、集菌し、上述の PCR 産物を実施例 1 に記載の方法で形質転換した。SD(His⁻)培地で 30℃、5~7 日間培養することにより GWT1 欠失株を得た。

GWT1 欠失株は生育が非常に遅いものの、その生育は前記式(I a)に記載の化合物の影響を受けず、GWT1 遺伝子産物が該化合物の標的であることが示唆された。また、GWT1 欠失株は、高温で生育できない、細胞が膨化しているといった特徴を示し、透過型電子顕微鏡による観察では、電子密度の高い菌体最外層の綿状線維構造が、消失していた。

実施例 1 2 GWT1 遺伝子産物を過剰発現した *S. cerevisiae* における前記式(I a)に記載の化合物の活性

S. cerevisiae CW63 株及び GWT1 遺伝子を導入した *S. cerevisiae* CW63/GWT1 を用い、実施例 2 に記載した方法に準じた方法で、前記式 (I a) に記載の化合物の活性を検討した。

その結果、*S. cerevisiae* CW63 株では、培養上清画分中のセファロスポリナーゼ活性が上昇し、細胞壁画分中の活性が低下している前記式 (I a) に記載の化合物濃度 ($0.39 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$) でも、*S. cerevisiae* CW63/GWT1 株では影響が見られず、また *S. cerevisiae* CW63 株では増殖が抑制される前記式 (I a) に記載の化合物濃度 ($> 3.13 \mu\text{g/ml}$) でも、*S. cerevisiae* CW63/GWT1 株では増殖抑制が見られなかった (図 6)。

実施例 13 (4-ブチルフェニル)(1-イソキノリル)ケトンの合成

窒素雰囲気下、マグネシウム 338 mg (13.9 ミリモル) とテトラヒドロフラン 6.5 ml の混合溶液に、1-ブロモ-4-ブチルベンゼン 2.29 ml (13.0 ミリモル) と開始剤として触媒量の 1, 2-ジブロモエタンを加え、10 分間還流下撹拌した。この溶液を 0°C まで冷却し、1-イソキノリンカルボニトリル 1.0 g (6.49 ミリモル) のテトラヒドロフラン溶液を加え、さらに室温で 1 時間、 70°C で 3 時間撹拌した。その後、再度 0°C に冷却し、濃塩酸 2.56 ml そしてメタノール 11 ml を加えた後、2 時間加熱還流した。濃縮後残渣を 5 規定水酸化ナトリウムとトルエンに溶解し、セライトで濾過した。濾液のトルエン層を分配し、水洗、硫酸マグネシウムで乾燥、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物 1.72 g を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta (\text{ppm}): 0.93(3\text{H}, \text{t}), 1.32\text{--}1.43(2\text{H}, \text{m}), 1.58\text{--}1.66(2\text{H}, \text{m}), 2.68(2\text{H}, \text{t}), 7.28(2\text{H}, \text{d}), 7.61(1\text{H}, \text{td}), 7.74(1\text{H}, \text{td}), 7.80(1\text{H}, \text{d}), 7.87(2\text{H}, \text{d}), 7.92(1\text{H}, \text{d}), 8.20(1\text{H}, \text{d}), 8.60(1\text{H}, \text{d})$

実施例 1 4 前記式 (I a) に記載の化合物 {1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン} の合成

実施例 1 3 の化合物 1.72 g (5.95 ミリモル)、ヒドラジン 1 水和物 836 mg (16.7 ミリモル) そして水酸化カリウム 769 mg (13.7 ミリモル) をジエチレングリコール 8.5 ml に加え、80℃で 1 時間、160℃で 3 時間半そして 200℃で 1 時間攪拌した。室温まで冷却後、氷水を加え酢酸エチルで抽出した。これを水洗後、硫酸マグネシウムで乾燥、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、前記式 (I a) に記載の化合物 914mg を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$ (ppm): 0.89(3H, t), 1.26-1.36(2H, m), 1.50-1.59(2H, m), 2.53(2H, t), 4.64(2H, s), 7.06(2H, d), 7.19(2H, d), 7.53(1H, td), 7.56(1H, d), 7.64(1H, td), 7.81(1H, d), 8.18(1H, dd,), 8.50(1H, d)

実施例 1 5 前記式 (I a) に記載の化合物 {1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン} の製造方法の別法

60%水素化ナトリウム 16 mg (0.40 ミリモル) のジメチルホルムアミド (1.8 ml) 溶液に窒素雰囲気下 -16℃で、Org.Synth., VI, 115(1988)の文献に基づいて合成した 1-シアノ-2-ベンゾイル-1,2-ジヒドロイソキノリン 100 mg (0.38 ミリモル) と 4-n-ブチルベンジルクロリド 70 mg (0.38 ミリモル) のジメチルホルムアミド (3.6 ml) 溶液を滴下し、さらに室温で 30 分間攪拌した。水を加え、濃縮し、残渣にトルエンと水を加えた。トルエン層を水洗後、炭酸カリウムで乾燥後、濃縮した。残渣のエタノール (1.6 ml) 溶液に 50%水酸化ナトリウム水溶液 (0.63 ml) を加え、2 時間加熱還流した。濃縮後、トルエンと水を加えた。トルエン層を水洗後、炭酸カルシウムで乾燥後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、前記式 (I a) に記載の化合物 18 mg を得た。

実施例 16 *S. cerevisiae* GWT1 遺伝子の、*C. albicans* ホモログのクローニング

HindIII (TaKaRa) で 16 時間処理した 25 μ g の *C. albicans* ゲノム DNA を、0.75% アガロースゲル電気泳動法により分離し、約 3.5 から 4.5 kb の大きさの DNA フラグメントをゲルから回収した。回収した DNA フラグメントを pKF3 ベクター

(TaKaRa) の HindIII サイトに挿入して、カンジダゲノムライブラリを作製した。

作製したライブラリを用いて約 1 万個のコロニーを LB/Ampicillin プレートに display した後、Colony/Plaque Screen (NEN) メンブレンを用いてコロニーリフトを行いハイブリダイゼーションに供した。プローブは、配列番号 1 に記載の約 1.5 kb の DNA フラグメント 20 ng を、ランダムプライマー法により alpha33P-dCTP でラベルし、GeneQuant カラム (Amersham-Pharmacia) を用いて精製し作製した。

ハイブリダイゼーションは、メンブレンを PerfectHyb™ (TOYOBO) 溶液に浸し 65°C で 1 時間プレインキュベーションをおこなった後、ラベルした上記プローブを添加し、65°C で更に 2.5 時間インキュベーションした。洗浄は、1). 2xSSC, 0.05% SDS 溶液 : 25°C 5 分、2). 2xSSC, 0.05% SDS 溶液 : 25°C 15 分、3). 0.1xSSC, 0.1% SDS 溶液 50°C 20 分で行った。洗浄後のメンブレンをサランラップで包み、X-RAY FILM (KONICA) に室温で 24 時間接触させた後現像した。感光したスポットに相当する大腸菌コロニーを分離して、2 次スクリーニングに供した。分離したコロニーを LB/Ampicillin プレートに約 200 個ずつ display し、1 次スクリーニング同様にコロニーリフトをおこないハイブリダイゼーションに供した。ハイブリダイゼーションの条件は 1 次スクリーニングと同一の条件でおこなった。

その結果、プローブと強く反応する大腸菌の単一なコロニーが分離された。このコロニーからプラスミドを回収し、含有する配列を決定したところ、実施例 9 で見出された配列 (配列番号 5) と同一の新規配列が見いだされ (カンジダ GWT1 の配列)、*C. albicans* ホモログであることが予想された。

実施例 17 *S. cerevisiae* GWT1 遺伝子の、*S. Pombe* ホモログ

データベース検索により、*S. cerevisiae* GWT1 遺伝子とホモロジーを示す *S. Pombe* 遺伝子（配列番号 27、及びその遺伝子産物のアミノ酸配列：配列番号 28）が見出され、GWT1 の *S. Pombe* ホモログであると考えられた。

実施例 18 *S. cerevisiae* GWT1 遺伝子の、*Aspergillus fumigatus* ホモログのクローニング

発明者らは遺伝子配列解析により、*S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans* の GWT1 遺伝子のコードする蛋白において高度に保存されている領域を 2 カ所見いだした（図 7）。この保存領域のアミノ酸をコードする DNA の予測から、配列番号 29、配列番号 30 及び配列番号 31 のプライマーを設計した。STRATAGENE 社から購入したライブラリ（*Aspergillus fumigatus* cDNA library:#937053）1 μ l を鋳型に用いて、配列番号 29 および配列番号 31 のプライマーを用いて PCR 増幅をおこなった。さらにこの増幅サンプル 1 μ l を鋳型に、配列番号 29 および配列番号 30 のプライマーで nested-PCR をおこなった結果、約 250 bp の単一フラグメントの増幅が確認された。このフラグメントの配列を決定したところ配列番号 32 に示す、*S. cerevisiae* の GWT1 遺伝子と相同性を有する新規の配列が得られ、これが *A. fumigatus* のホモログであることが予想された。

全長の cDNA を獲得するために、増幅フラグメントの配列をもとに配列番号 33 および配列番号 34 のプライマーを設計した。また、ライブラリの遺伝子挿入部位の外側のプライマー配列番号 35 および配列番号 36 を設計した。*A. fumigatus* cDNA ライブラリを鋳型にして、配列番号 33 および配列番号 35 のプライマーセット、または配列番号 34 および配列番号 36 のプライマーセットを用いて PCR をおこなった結果、両者から約 1 kb の DNA フラグメントの増幅が確認された。これらのフラグメントの塩基配列を決定した結果、配列番号 1 に示す *S. cerevisiae* の GWT1 遺伝子と高い相同性を有する新規の配列が得られた。同配列は

- 52 -

S.cerevisiae, *S.pombe*, *C.albicans* の GWT1 遺伝子と全体を通じて高い相同性を有することから、この配列が *A.fumigatus* のホモログであることが強く示唆された。

A.fumigatus のホモログ全体をクローニングするために、得られた配列をもとに、開始コドン上流に相当する配列番号 37 に示すプライマーおよび終止コドン下流に相当するプライマー配列番号 38 を新たに設計した。*A.fumigatus* cDNA ライブラリ (STRATAGENE 社) および *A.fumigatus* ゲノムライブラリ (STRATAGENE 社) を鋳型に、配列番号 37 および配列番号 38 のプライマーで 35 サイクルの PCR をおこなった結果、両方の鋳型から約 1.6kb の単一な増幅フラグメントが検出された。このフラグメントの塩基配列をダイレクトシーケンスによって決定した結果、cDNA ライブラリからは配列番号 39 に示す塩基配列が見いだされ、配列番号 40 に示す 501 アミノ酸からなる蛋白をコードしていることが示唆された。また、ゲノムライブラリからは配列番号 41 に示す塩基配列が見いだされ、77 塩基対からなるイントロンを 1 カ所所有していることが判った。

実施例 19 *S. cerevisiae* GWT1 遺伝子の、*Cryptococcus* ホモログのクローニング

1). データベースサーチ

データベースサーチによって *S. cerevisiae* GWT1 遺伝子と相同性のある遺伝子を検索した結果、スタンフォード大学のゲノムセンターのサーバー

(<http://baggage.stanford.edu/cgi-misc/cneoformans/>) から、502042C05.x1 の配列を見いだした。また、米国オクラホマ大学のサーバー

(http://www.genome.ou.edu/cneo_blast.html) から、b6e06cn.f1 の配列を見いだした。

2). ゲノム DNA を鋳型とした PCR

502042C05.x1 の配列をもとに配列番号 4 2 のプライマーを作製し、また b6e06cn.f1 の配列をもとに配列番号 4 3 のプライマーを作製した。クリプトコッカス (*Cryptococcus neoformans*) のゲノム DNA を鋳型にして、配列番号 4 2 のプライマーおよび配列番号 4 3 のプライマーを用いて PCR 増幅を行ったところ、約 2 kb の増幅フラグメントが検出された。このフラグメントの塩基配列を決定したところ、配列番号 4 4 に示す、*S. cerevisiae* の GWT1 遺伝子と相同性を有する新規の配列が得られた。

クリプトコッカス GWT1 遺伝子の開始コドン上流の配列を獲得するために、502042C05.x1 の配列をもとに配列番号 4 5 のプライマーを設計し、また配列番号 4 4 の配列をもとに配列番号 4 6 のプライマーを設計した。クリプトコッカスのゲノム DNA を鋳型にして、配列番号 4 5 のプライマーおよび配列番号 4 6 のプライマーを用いて PCR 増幅を行ったところ、約 500 bp の増幅フラグメントが検出された。このフラグメントの塩基配列を決定したところ、配列番号 4 7 に示す配列が得られ、配列番号 4 4 とオーバーラップすることが判った。

3). 3' -RACE

クリプトコッカス GWT1 遺伝子の 3' 末端の配列を得るために、3' -RACE をおこなった。クリプトコッカスから抽出した 16 μ g の total RNA をもとに配列番号 4 8 で示す adaptor-primer でプライミングし、SuperScript II Reverse Transcriptase (GIBCO/BRL 社製) を用いて逆転写反応をおこない、以降の RT-PCR の鋳型となる 1 本鎖 cDNA を作製した。1 本鎖 cDNA を鋳型に、配列番号 4 9 および配列番号 5 0 に示すプライマーで 35 サイクルの PCR をおこなった結果、約 1.2 kb の増幅フラグメントが検出された。このフラグメントの塩基配列を Direct-Sequence 法によって解析したところ、配列番号 5 1 に示す、*S. cerevisiae* の GWT1 遺伝子と相同性を有する新規の配列が得られた。

4). 全長ゲノム DNA の PCR

- 54 -

配列番号 4 7 をもとに設計した配列番号 5 2 のプライマーおよび、配列番号 5 1 をもとに設計した配列番号 5 3 のプライマーを用いて、クリプトコッカスのゲノム DNA を鋳型に独立した 3 本の preparation で 35 サイクルの PCR をおこなった。その結果、独立した 3 本の tube からはいずれも約 2 kb の増幅フラグメントが検出されたので、それぞれ個別に Direct-Sequence に供し、全塩基配列を決定した。その結果、3 つの独立した配列は完全に一致し、配列番号 5 4 に示すクリプトコッカスの GWT1 遺伝子ホモログ全長を含む配列が得られた。

5). cDNA 配列の決定

配列番号 5 4 に示すゲノム由来のクリプトコッカス GWT1 遺伝子配列を、3'-RACE によって得られた cDNA 配列 5 1 と比較することにより、2 カ所のイントロンの存在が示唆された。また、開始 ATG 以降の Open Reading Frame が通っていないことから、さらにもう 1 カ所のイントロンの存在が示唆された。そこで、予想されるアミノ酸配列およびスプライシング・ドナー/アクセプター配列から、cDNA 構造を予測し、エクソン間のジャンクションと予想される部位に、配列番号 5 5 および配列番号 5 6 で示すプライマーを設計した。クリプトコッカス由来の一本鎖 cDNA をテンプレートに上記プライマーを用いて 35 サイクルの PCR をおこなった結果、約 1.4 kb の増幅フラグメントが確認された。同フラグメントを Direct-Sequence に供し塩基配列の決定をおこなった結果、配列番号 5 7 に示す配列が得られ、配列番号 5 4 と照合することにより、クリプトコッカスの GWT1 遺伝子の cDNA 配列が配列番号 5 8 に示す構造であることが示唆された。同配列は *S.cerevisiae*, *S.pombe*, *C.albicans*, *A.fumigatus* の GWT1 遺伝子と部分的に高い相同性を有することから、この配列がクリプトコッカスのホモログであることが強く示唆された。

実施例 20 GWT1 蛋白を発現した膜画分の調製

(1). GWT1 発現ベクターの作製

- 55 -

S.cerevisiae で働く発現ベクターを作製するため、YEp352 のマルチクローニングサイトに pKT10 (Tanaka et al, Mol. Cell Biol., 10:4303-4313, 1990) 由来の GAPDH プロモーターおよび GAPDH ターミネーターを挿入し、更にマルチクローニングサイトを pUC18 マルチクローニングサイトに置き換えて YEp352GAPII を作製した。また GWT1 遺伝子の挿入を容易にするため、マルチクローニングサイトに存在する Sall サイトを ClaI サイトに変換した YEp352GAPIIClaI δ Sal を作製した。

配列番号 1 に記載の塩基配列を含む *S.cerevisiae* GWT1 遺伝子を配列番号 6 4 に記載のプライマーおよび配列番号 6 5 に記載のプライマーを用いて増幅し、YEp352GAPIIClaI δ Sal ベクターのマルチクローニングサイトに挿入して GWT1 過剰発現プラスミドを作製した。

(2). 膜画分の調製

S.cerevisiae G2-10 株を、10 ml の YPD 培地にて 30°C で振とう培養し、対数増殖後期 ($OD_{600}=2\sim5$) の時点で集菌した。滅菌水で洗浄後、YEAST MAKERTM Yeast Transformation System (Clontech 社製) を用いた酢酸リチウム法 (YEAST MAKERTM Yeast Transformation System User Manual に記載) によって、上記プラスミドおよび GWT1 を含まない空ベクターを *S. cerevisiae* G2-10 株に導入した。SD(ura-) 培地で 30°C、2 日間培養することにより GWT1 または変異 GWT1 過剰発現株および空ベクター導入株を得た。これらの株をそれぞれ SD (ura-) 液体培地にて 30°C で振とう培養し、対数増殖中期 ($OD_{600}=1\sim3$) の時点で集菌した。菌体を 10 mM Na₂SO₄ で洗浄した後、菌体量の 3 倍量の Homogenization buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 10 mM EDTA, CompleteTM (Roche 社製) 1 tablet / 25 ml) にて懸濁し、4 倍量のガラスビーズを加えた。これを 30 秒間ボルテックスして 30 秒間氷上に置く操作を 4 回繰り返すことにより菌体を破碎した。ここに 1 ml の Homogenization buffer を加え、4°C で 2,500 rpm、5 分間遠心してガラスビーズおよび未破碎の菌体を沈殿させた。上清を別のチューブにとり、4°C で 135,000 rpm、10 分間遠心す

- 56 -

ることによりオルガネラを含む膜画分(Total membrane fraction)を沈殿させた。沈殿を 1 ml の Binding buffer (0.1 M Phosphate buffer, pH 7.0, 0.05% Tween 20, Complete™ (Roche 社製) 1 tablet / 50 ml) に懸濁し、4°C で 2,500 rpm, 1 分間遠心することにより懸濁されなかった部分を取り除き、上清を 4°C で 15,000 rpm, 5 分間遠心した。沈殿を 150~650 μ l の Binding buffer に再懸濁し、膜画分とした。

実施例 2 1 標識化合物の結合実験

(1). 標識化合物の合成

化合物リストの 1 に記載の化合物(1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン) (「化合物 1」と称する) 10 mg(0.036 mmol)、酸化パラジウム 20mg そしてパラジウム-炭素 (10%) 10 mg をメタノール 1 ml に溶解し、10 Ci のトリチウムガスの下で、50 分間攪拌した。その後、反応混合物をろ過し、ろ液を濃縮乾固した。活性なトリチウムを除去するためにメタノールに溶解し、濃縮乾固を 3 回繰り返した。残渣をハイパフォーマンス液体クロマトグラフィーにより分離精製した。目的物のピークの画分を集め、濃縮乾固し、エタノールに溶解した。

(2). 結合実験

調製した膜画分 100 μ l に 1 ng の [3 H] 化合物 1 を加え、氷上にて 1~2 時間静置することにより [3 H] 化合物 1 と膜画分との結合反応を行った。その後 4°C で 15,000 rpm, 3 分間遠心し膜画分を沈殿させた。沈殿を 150 μ l の Binding buffer にて懸濁し、4°C で 15,000 rpm, 3 分間遠心する操作を 2 回繰り返して、結合していない [3 H] 化合物 1 を除去した。沈殿を 80 μ l の Binding buffer に懸濁し放射能測定用バイアルに移し、6 ml のシンチレーターを加えて、液体シンチレーションカウンター(Aloka)にて放射活性を測定した。

その結果、図 8 に示すように、GWT1 遺伝子を挿入していないベクターを導入した株 (vector) の膜画分に対しては [3 H] 化合物 1 の結合がほとんど見られないの

に対し、GWT1 を過剰発現させた株 (GWT1) では結合量が著しく増加した。またこの増加した結合は 100 倍量の非標識 (cold) の化合物 1 を共存させることによって完全に阻害された。以上のことより、 $[^3\text{H}]$ 化合物 1 が膜画分中の GWT1 蛋白に特異的に結合していることが示唆された。

実施例 2 2 被検化合物による $[^3\text{H}]$ 化合物 1 の結合阻害実験

本アッセイ系を用いて、 $[^3\text{H}]$ 化合物 1 と GWT1 との結合を阻害する化合物をスクリーニングできるかを検討した。調製した膜画分 100 μl に 100 ng の被検化合物 (1-(4-ブロモベンジル)イソキノリン; 「化合物 17」と称する)、または 1-[4-(tert-ブチル)ベンジル]イソキノリン: 「化合物 7」と称する) 及び 1 ng の $[^3\text{H}]$ 化合物 1 を加え、氷上にて 1~2 時間静置して、被検化合物及び $[^3\text{H}]$ 化合物 1 と膜画分との結合反応を行い、実施例 2 1 の記載に従って洗浄・放射活性の測定を行った。

図 9 に示すように、 $[^3\text{H}]$ 化合物 1 の膜画分への結合は、標識していない化合物 1 をそれぞれ 1 倍量、10 倍量、100 倍量共存させることにより濃度依存的に阻害された。また、この結合は実施例 2 に記載のレポーター系において化合物 1 と同等の活性をもつ類縁体の化合物 17 ($\text{IC}_{50} = 0.78 \mu\text{g/ml}$) を 100 倍量共存させることによっても阻害された。一方、レポーター系で全く活性を示さない類縁体の化合物 7 ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$) を 100 倍量共存させても全く阻害されなかった。以上のことから、本アッセイ系が GWT1 タンパク質と結合する化合物を選択する手法として使用できることが示された。

実施例 2 3 標識化合物の *Candida albicans* GWT1 遺伝子産物に対する結合実験

(1). *Candida albicans* GWT1 発現ベクターの作製

Candida albicans GWT1 遺伝子 (以下 CaGWT1 と称す、塩基配列は配列番号 3 及び配列番号 5 に記載) を配列番号 6 6 及び配列番号 6 7 に記載のプライマーを用

いて増幅し、YEp352GAPII ベクターのマルチクローニングサイトに挿入して CaGWT1 過剰発現プラスミドを作製した。

(2) 膜画分の調製

実施例 20 に記載の方法により、上記 CaGWT1 発現プラスミド及び GWT1 発現プラスミドを *S. cerevisiae* G2-10 株に導入し、CaGWT1 または GWT1 過剰発現株を得た。これらの株より実施例 20 に記載の方法に従って、膜画分を調製した。

(3) 結合実験

実施例 21 の記載に従って、 $[^3\text{H}]$ 化合物 1 との結合実験を行った。

図 10 に示すように、CaGWT1 を過剰発現させた株の膜画分では、GWT1 を過剰発現させた株と同様に結合量が著しく増加した。またこの増加した結合は 100 倍量の非標識 (cold) の化合物 1 を共存させることによって完全に阻害された。以上のことより、膜画分中の CaGWT1 蛋白に対しても $[^3\text{H}]$ 化合物 1 は特異的に結合しており、本アッセイ系により CaGWT1 タンパク質と結合する化合物を選択できることが示唆された。

実施例 24

実施例 2 に記載した *S. cerevisiae* レポーター系を用いて化合物を評価した。細胞壁画分のセファロsporinaゼ活性が化合物無処理時の 50%以下になる最小濃度を IC50 値とした。代表的な化合物の効果を表 1 に示す。

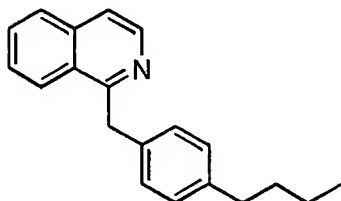
表 1

化合物 IC50 (μg/ml)	
1-(4-ブチルベンジル) イソキノリン (化合物 1)	0.39
N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル] -2-プロピニル}アセトアミド (化合物 40)	6.25
N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロピル} - N-メチルアセトアミド (化合物 50)	50
5-ブチル-2-(1-イソキノリルメチル)フェノール (化合物 56)	0.20
4-(4-ブチルベンジル)チエノ[3,2-c]ピリジン (化合物 134)	0.78
7-(4-ブチルベンジル)チエノ[2,3-c]ピリジン (化合物 140)	0.39
2-(4-ブチルベンジル)-3-メトキシピリジン (化合物 159)	0.78
2-(4-ブチルベンジル)-3,4-ジメトキシピリジン (化合物 166)	0.78

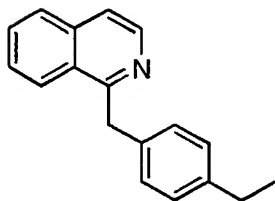
本実施例における評価に用いた化合物およびその合成に関しては、特願 2001-401947 を参照のこと。その中の代表的な化合物のリストを以下に示す。

<化合物リスト>

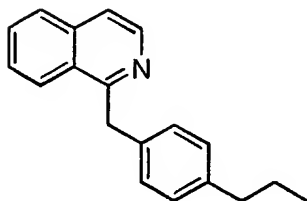
1. 1-(4-ブチルベンジル) イソキノリン



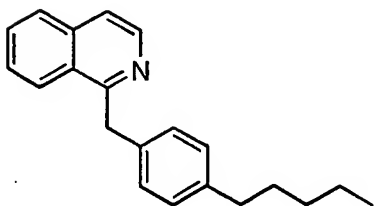
2. 1-(4-エチルベンジル) イソキノリン



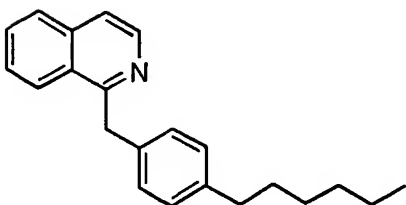
3. 1-(4-プロピルベンジル) イソキノリン



4. 1-(4-ペンチルベンジル) イソキノリン

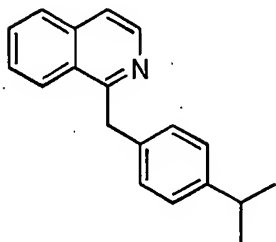


5. 1-(4-ヘキシルベンジル) イソキノリン

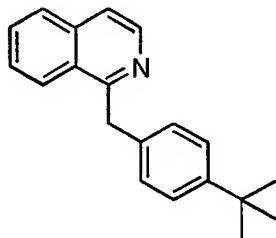


- 61 -

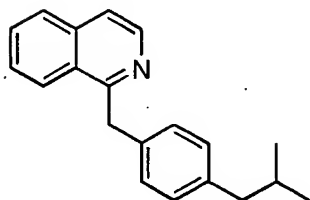
6. 1-(4-イソプロピルベンジル) イソキノリン



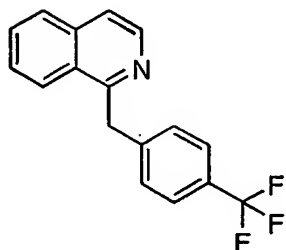
7. 1-[4-(tert-ブチル)ベンジル]イソキノリン



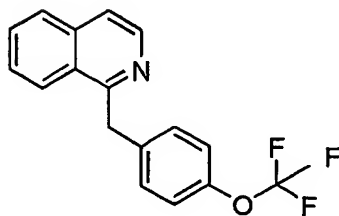
8. 1-(4-イソブチルベンジル)イソキノリン



9. 1-[4-(トリフルオロメチル)ベンジル]イソキノリン

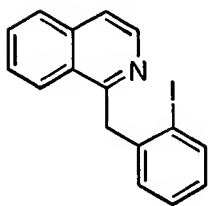


10. 1-[4-(トリフルオロメトキシ)ベンジル]イソキノリン

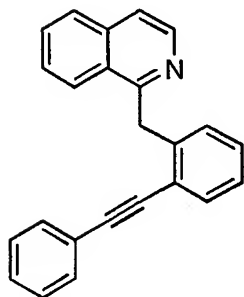


11. 1-(2-ヨードベンジル)イソキノリン

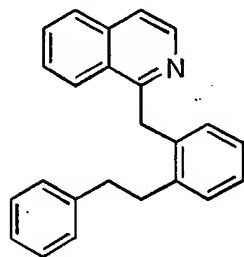
- 62 -



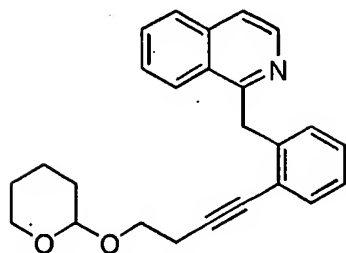
12. 1-[2-(2-フェニル-1-エチニル)ベンジル]イソキノリン



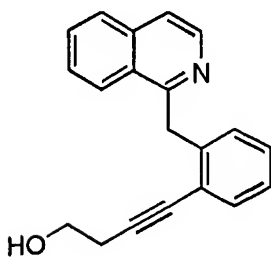
13. 1-(2-フェニルエチルベンジル)イソキノリン



14. 1-{2-[4-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]ベンジル}イソキノリン

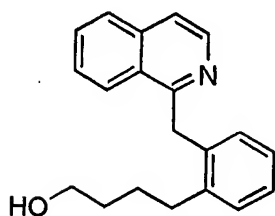


15. 4-[2-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチン-1-オール

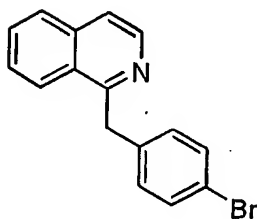


- 63 -

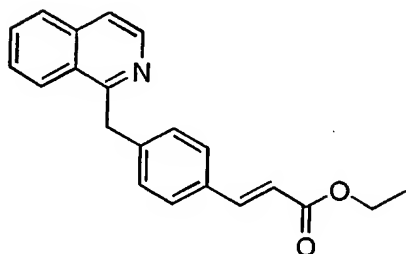
16. 4-[2-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-ブタノール



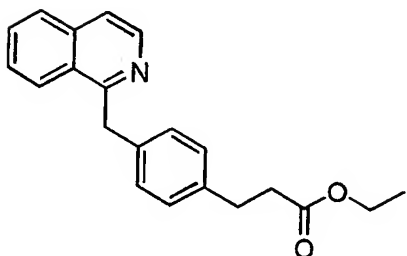
17. 1-(4-ブロモベンジル)イソキノリン



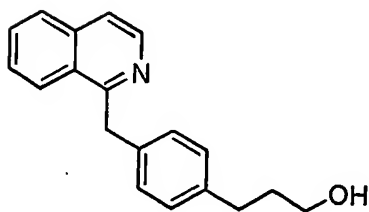
18. エチル(E)-3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロペノエート



19. エチル 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロパノエート

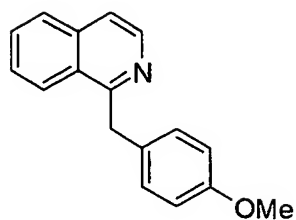


20. 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-プロパノール

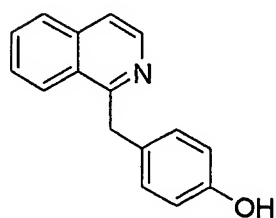


21. 1-(4-メトキシベンジル)イソキノリン

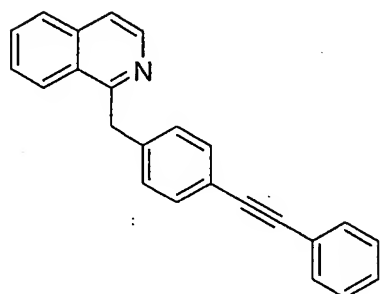
- 64 -



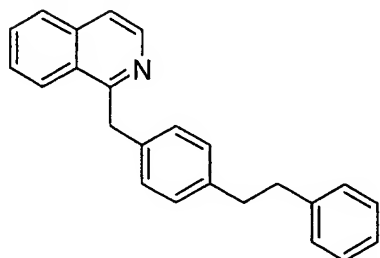
22. 4-(1-イソキノリルメチル)フェノール



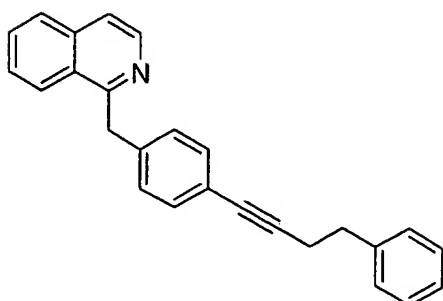
23. 1-[4-(2-フェニル-1-エチニル)ベンジル]イソキノリン



24. 1-(4-フェネチルベンジル)イソキノリン

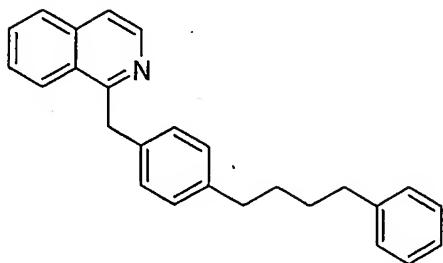


25. 1-[4-(4-フェニル-1-ブチニル)ベンジル]イソキノリン

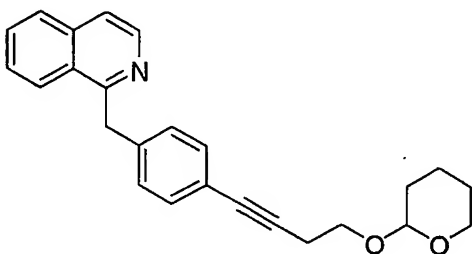


- 65 -

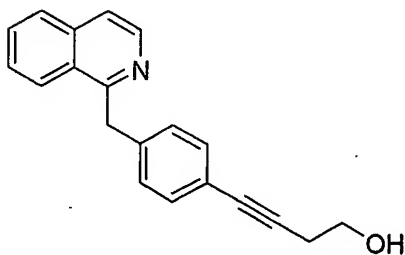
26. 1-[4-(4-フェニル-1-ブチル)ベンジル]イソキノリン



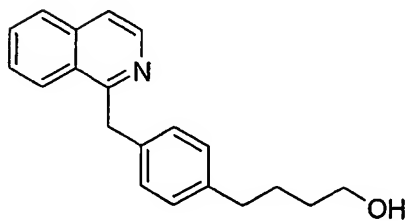
27. 1-{4-[4-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]ベンジル}イソキノリン



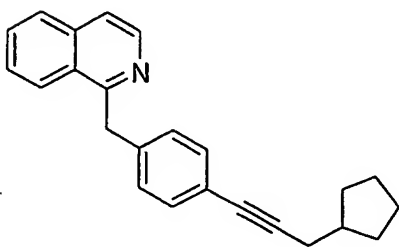
28. 4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチン-1-オール



29. 4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-ブタノール

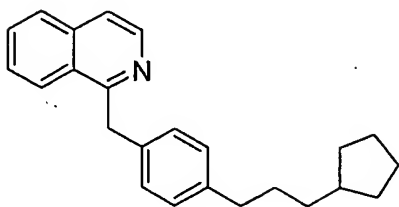


30. 1-[4-(3-シクロペンチル-1-プロピニル)ベンジル]イソキノリン

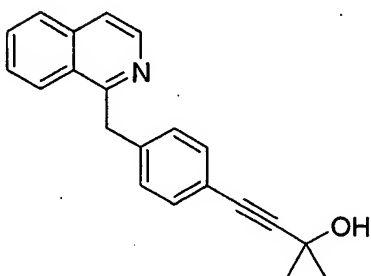


- 66 -

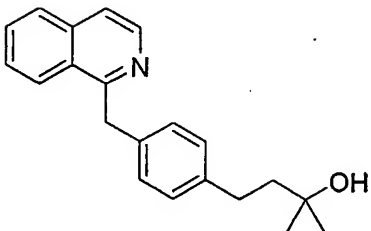
3 1 . 1-[4-(3-シクロペンチルプロピル)ベンジル]イソキノリン



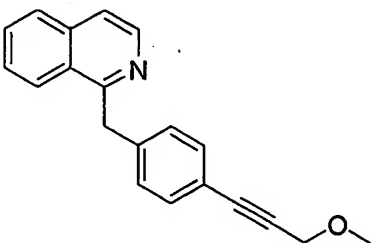
3 2 . 4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-メチル-3-ブチン-2-オール



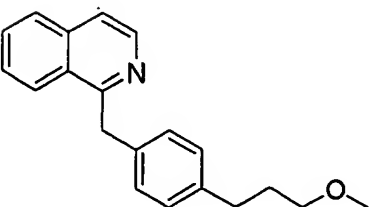
3 3 . 4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-メチル-2-ブタノール



3 4 . 1-[4-(3-メトキシ-1-プロピニル)ベンジル]イソキノリン

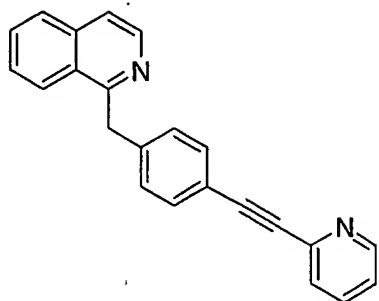


3 5 . 1-[4-(3-メトキシプロピル)ベンジル]イソキノリン

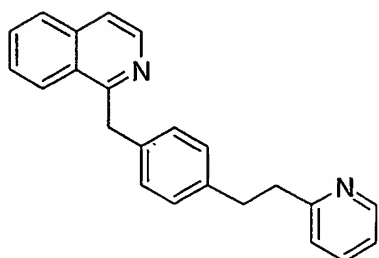


- 67 -

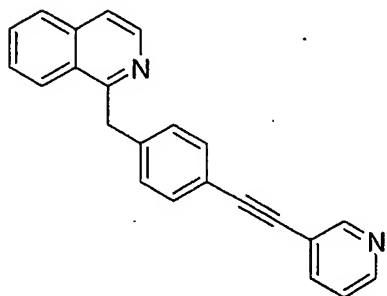
36. 1-{4-[2-(2-ピリジル)-1-エチニル]ベンジル}イソキノリン



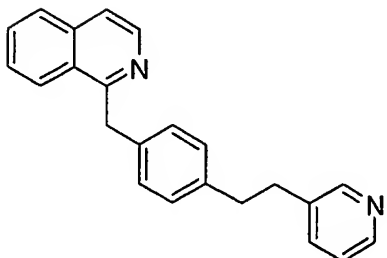
37. 1-{4-[2-(2-ピリジル)エチル]ベンジル}イソキノリン



38. 1-{4-[2-(3-ピリジル)-1-エチニル]ベンジル}イソキノリン

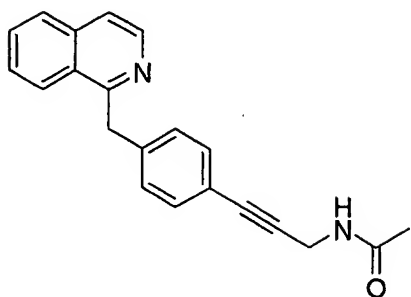


39. 1-{4-[2-(3-ピリジル)エチル]ベンジル}イソキノリン

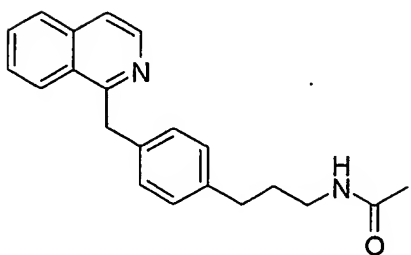


40. N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピニル}アセトアミド

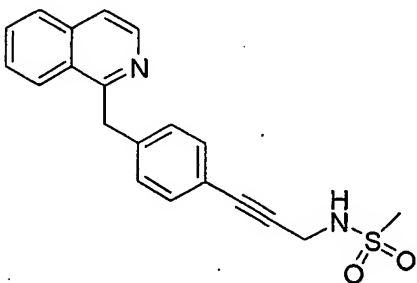
- 68 -



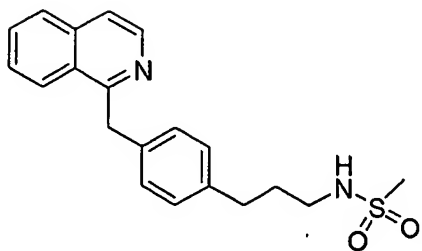
4 1. N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロピル}アセトアミド



4 2. N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピニル}メタンスルホンアミド

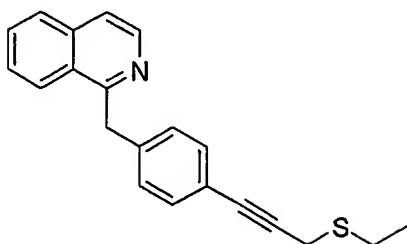


4 3. N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロピル}メタンスルホンアミド

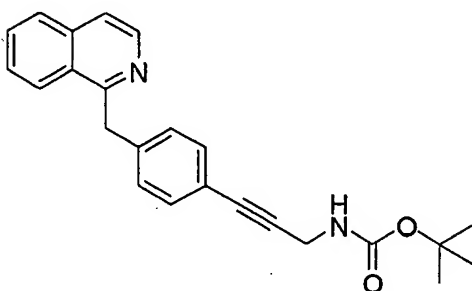


4 4. 1-{4-[3-(エチルスルファニル)-1-プロピニル]ベンジル}イソキノリン

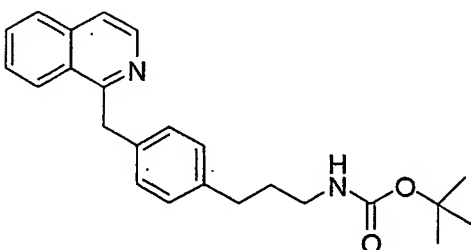
- 69 -



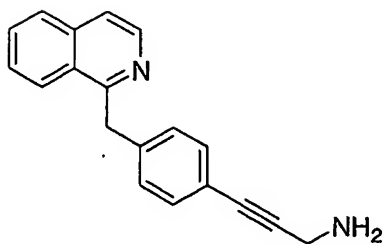
45. tert-ブチル N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピニル}
カルバメート



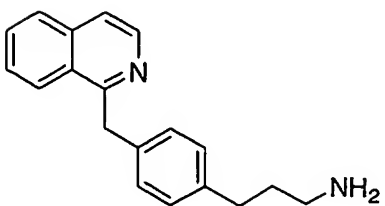
46. tert-ブチル N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロピル}カルバ
メート



47. 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピン-1-イル-アミン

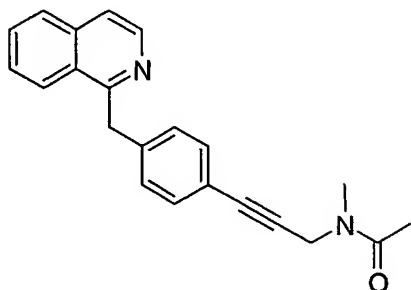


48. 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-プロパンアミン

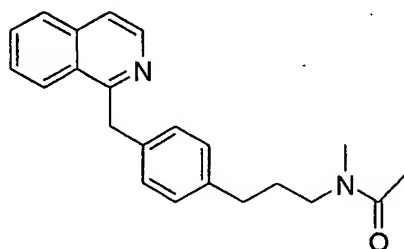


- 70 -

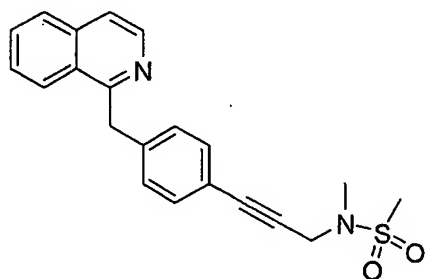
49. N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピニル}-N-メチルアセトアミド



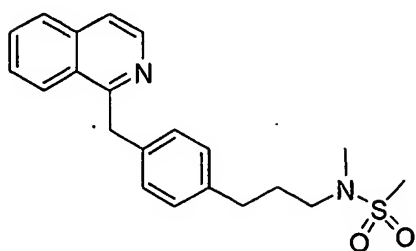
50. N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロピル}-N-メチルアセトアミド



51. N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピニル}-N-メチルメタンスルホンアミド

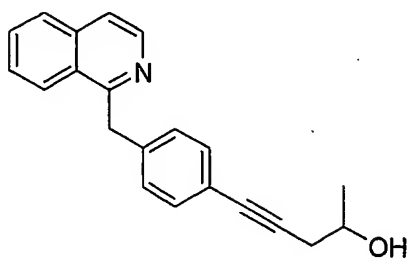


52. N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロピル}-N-メチルメタンスルホンアミド

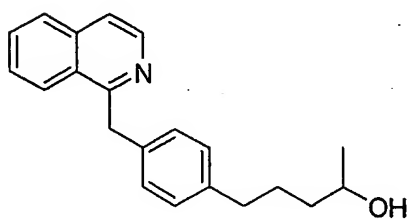


- 71 -

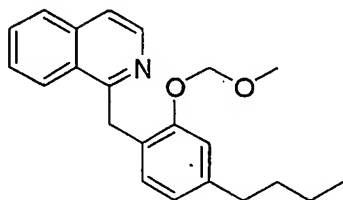
53. 5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチン-2-オール



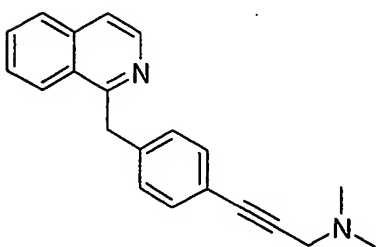
54. 5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-ペンタノール



55. 1-[4-ブチル-2-(メトキシメトキシ)ベンジル]イソキノリン

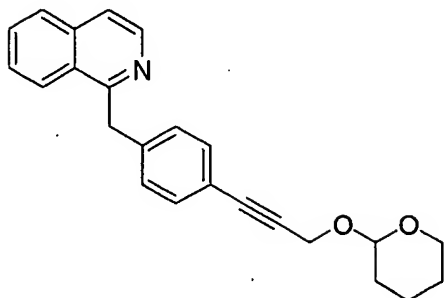


56. 5-ブチル-2-(1-イソキノリルメチル)フェノール

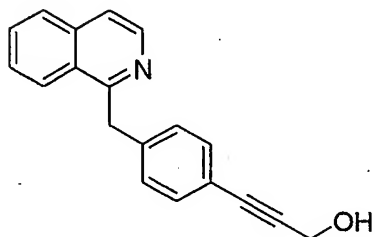
57. N-{3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピニル}-N,N-ジメチル
アミン

- 72 -

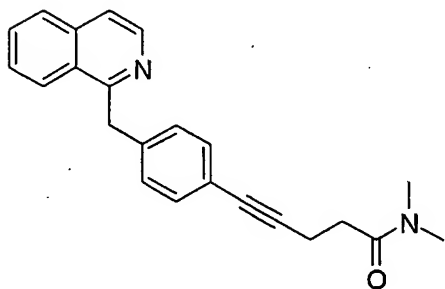
58. 1-{4-[3-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-プロピニル]ベンジル}イソキノリン



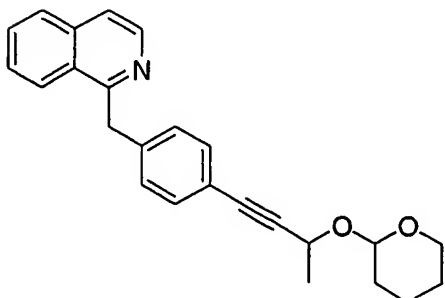
59. 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロピン-1-オール



60. N,N-ジメチル-5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチンアミド

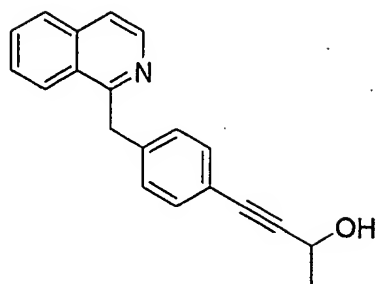


61. 1-{4-[3-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]ベンジル}イソキノリン

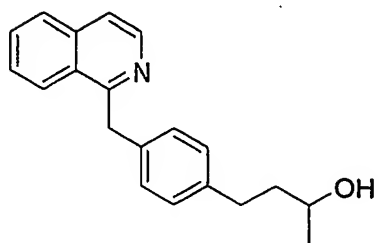


62. 4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチン-2-オール

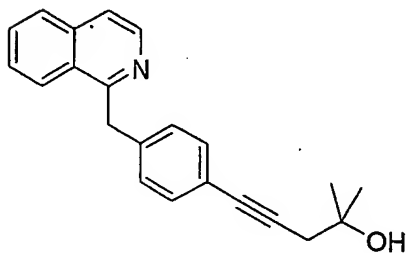
- 73 -



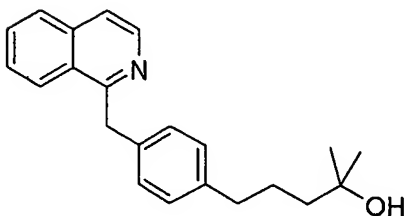
63. 4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-ブタノール



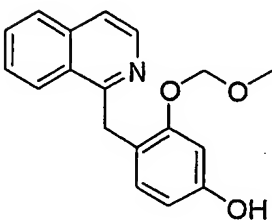
64. 5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-メチル-4-ペンチン-2-オール



65. 5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-メチル-2-ペンタノール

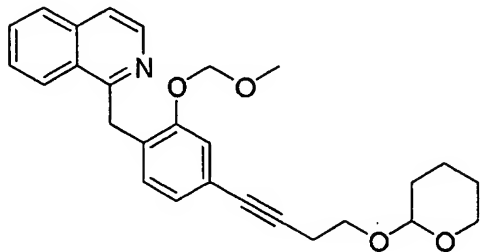


66. 4-(1-イソキノリルメチル)-3-(メトキシメトキシ)フェノール

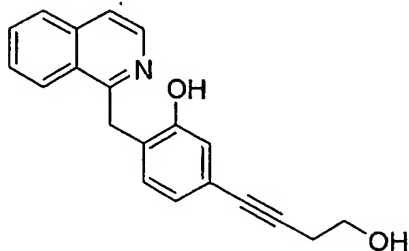


- 74 -

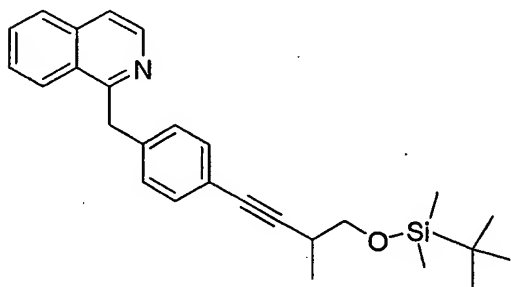
67. 1-{2-(メトキシメトキシ)-[4-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]ベンジル}イソキノリン



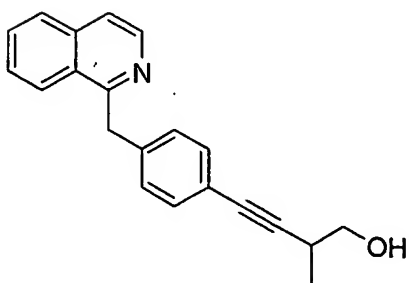
68. 5-(4-ヒドロキシ-1-ブチニル)-2-(1-イソキノリルメチル)フェノール



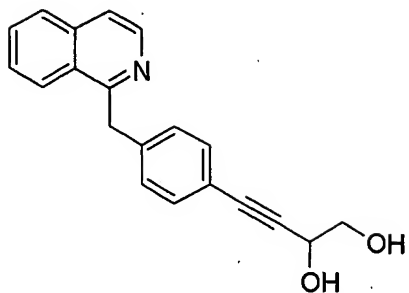
69. 1-(t-ブチル)-1,1-ジメチルシリル[4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-メチル-3-ブチニル]エーテル



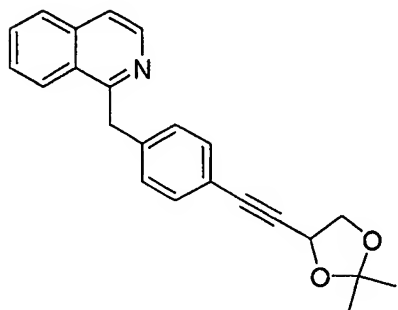
70. 4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-メチル-3-ブチン-1-オール



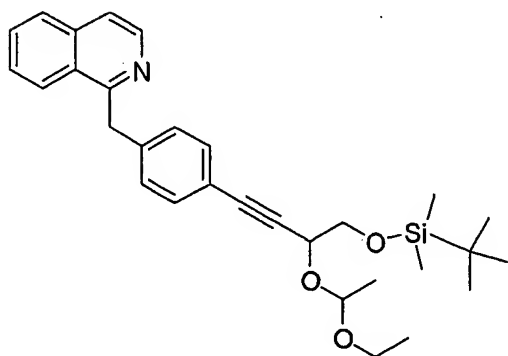
71. 4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチン-1,2-ジオール



7 2.1-{4-[2-(2,2-ジメチル-1,3-ジオキサラン-4-イル)-1-エチニル]ベンジル}
イソキノリン

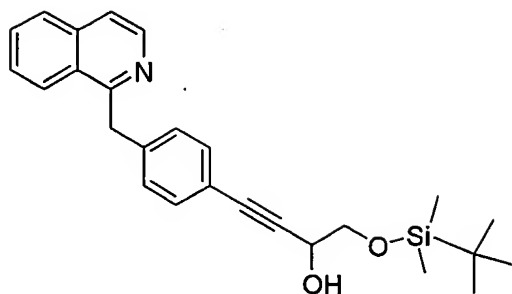


7 3.1-{4-[4-{[1-(*t*-ブチル)-1,1-ジメチルシリル]オキシ}-3-(1-エトキシエトキシ) -1-ブチニル]ベンジル}イソキノリン

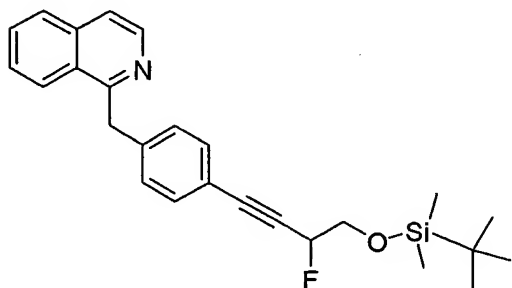


74.1-[1-(*t*-ブチル)-1,1-ジメチルシリル]オキシ]4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチン-2-オール

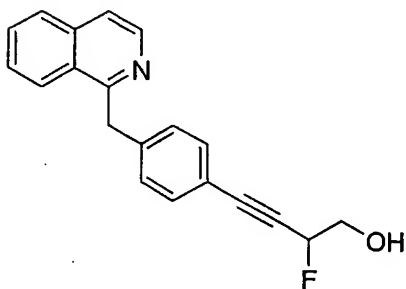
- 76 -



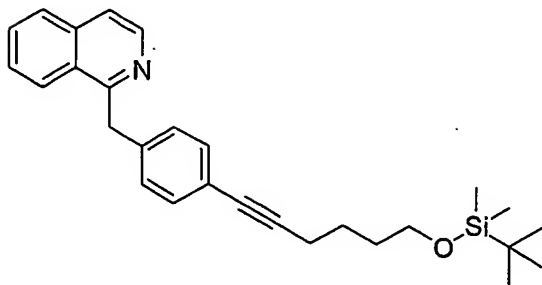
75. 1-(*t*-ブチル)-1,1-ジメチルシリル{2-フルオロ-4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチニル}エーテル



76. 2-フルオロ-4-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-3-ブチン-1-オール

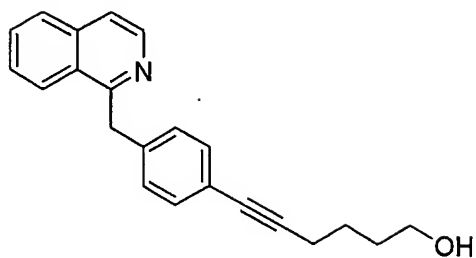


77. 1-(*t*-ブチル)-1,1-ジメチルシリル{6-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-5-ヘキシニル}エーテル

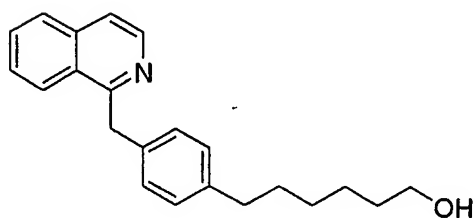
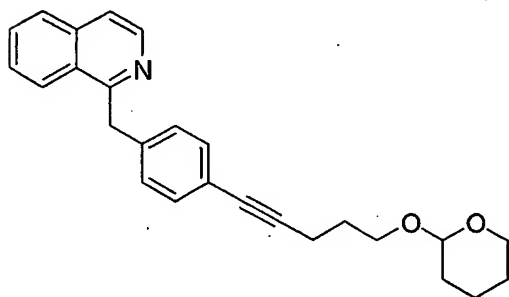


78. 6-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-5-ヘキシン-1-オール

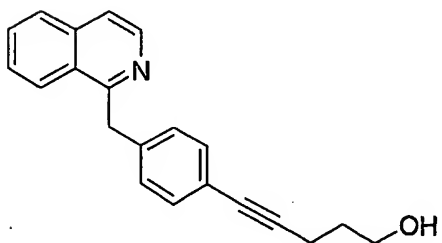
- 77 -



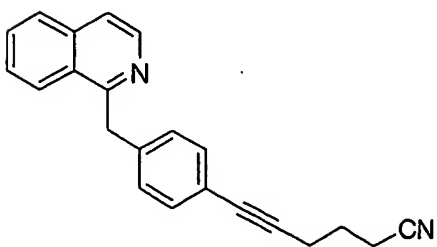
79. 6-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-ヘキサノール

80. 1-{4-[5-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ペンチニル]ベンジル}
イソキノリン

81. 5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチン-1-オール

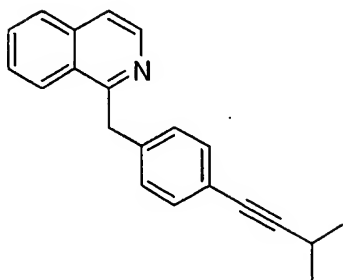


82. 5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチニルシアニド

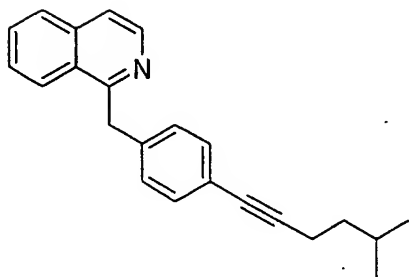


- 78 -

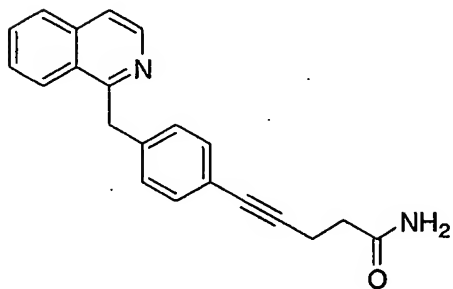
83. 1-[4-(3-メチル-1-ブチニル)ベンジル]イソキノリン



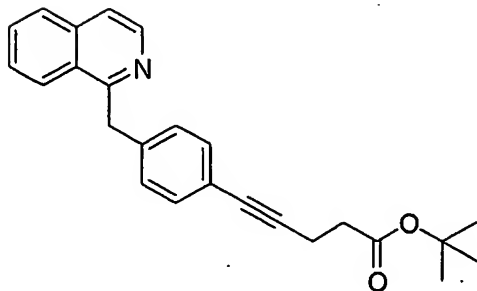
84. 1-[4-(5-メチル-1-ヘキシニル)ベンジル]イソキノリン



85. 5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチンアミド

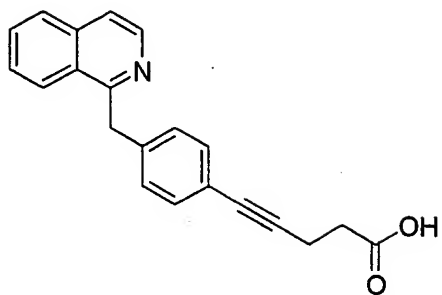


86. t-ブチル 5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチノエート

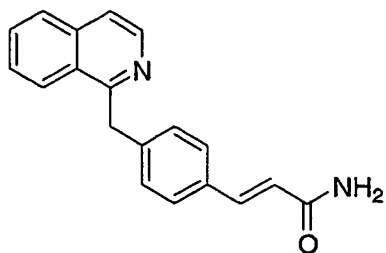


87. 5-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-4-ペンチノイック酸

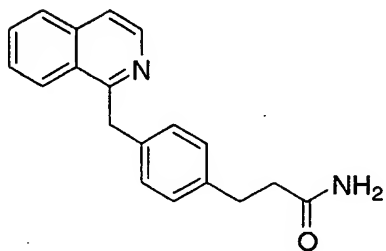
- 79 -



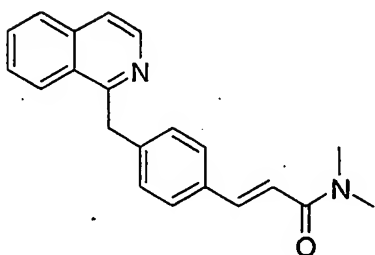
88. (E)-3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロペンアミド



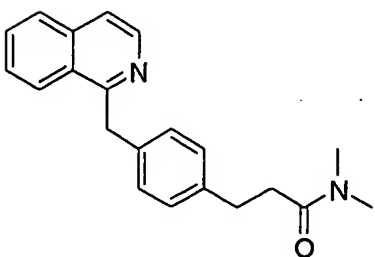
89. 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロパンアミド



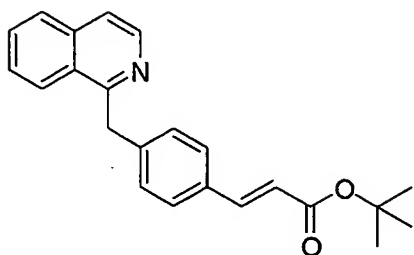
90. N,N-ジメチル-(E)-3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロペンアミド



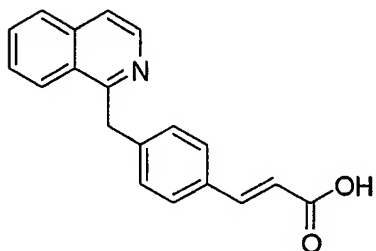
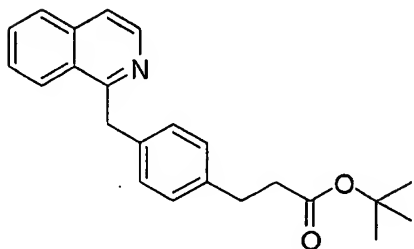
91. N,N-ジメチル 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロパンアミド



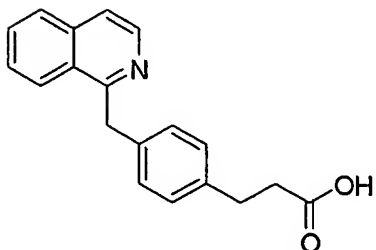
- 80 -

92. *t*-ブチル(E)-3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロペノエート

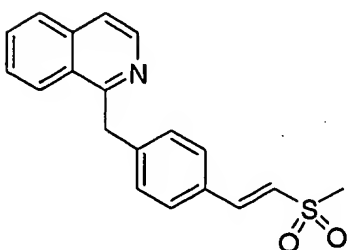
93. (E)-3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-2-プロペノイック酸

94. *t*-ブチル 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロパノエート

95. 3-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]プロパノイック酸

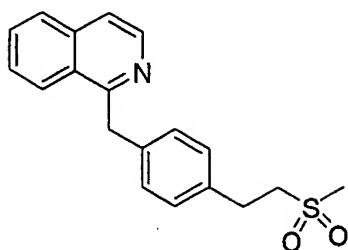


96. (E)-2-[4-(1-イソキノリルメチル)フェニル]-1-エテニルメチルスルホン

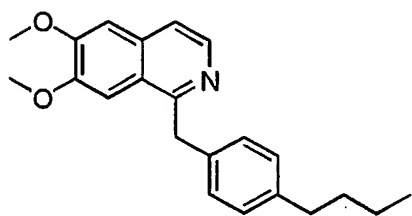


97. 1-{4-[2-(メチルスルホニル)エチル]ベンジル}イソキノリン

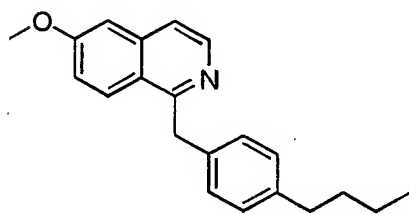
- 81 -



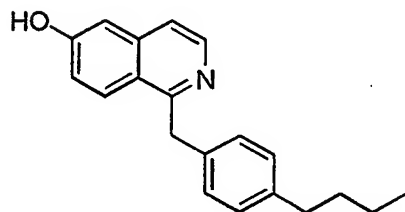
98. 1-(4-ブチルベンジル)-6,7-ジメトキシイソキノリン



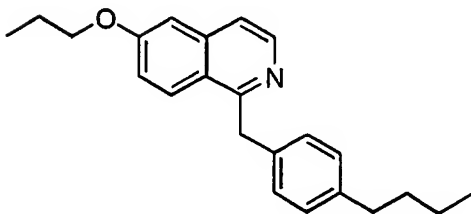
99. 1-(4-ブチルベンジル)-6-メトキシイソキノリン



100. 1-(4-ブチルベンジル)-6-イソキノリノール

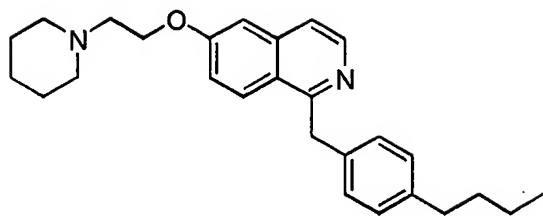


101. 1-(4-ブチルベンジル)-6-プロポキシイソキノリン

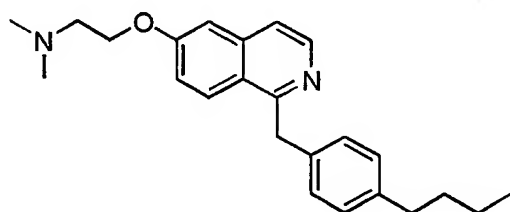


102. 1-(4-ブチルベンジル)-6-(2-ピペリジノエトキシ)イソキノリン

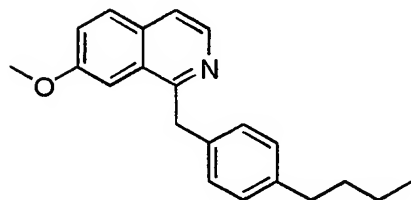
- 82 -



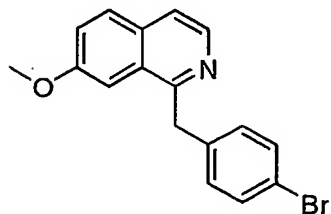
103. N-(-{[1-(4-ブチルベンジル)-6-イソキノリル]オキシ}エチル)-N,N-ジメチルアミン



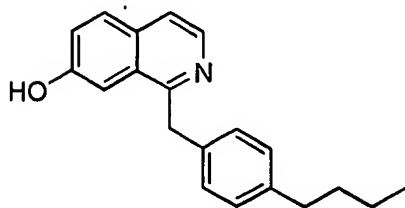
104. 1-(4-ブチルベンジル)-7-メトキシイソキノリン



105. 1-(4-ブロモベンジル)-7-メトキシイソキノリン

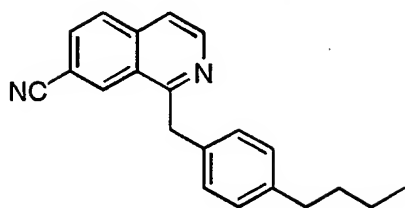


106. 1-(4-ブチルベンジル)-7-イソキノリノール

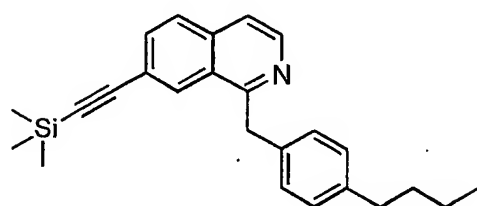


107. 1-(4-ブチルベンジル)-7-イソキノリンカルボニトリル

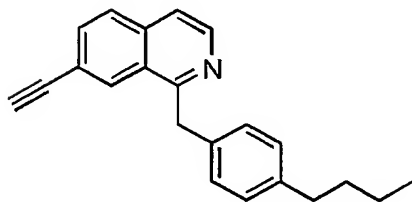
- 83 -



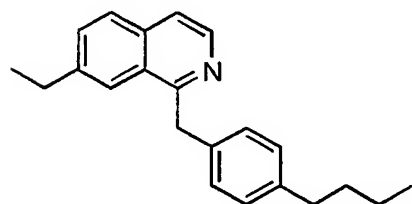
108. 1-(4-ブチルベンジル)-7-[2-(1,1,1-トリメチルシリル)-1-エチニル]イソキノリン



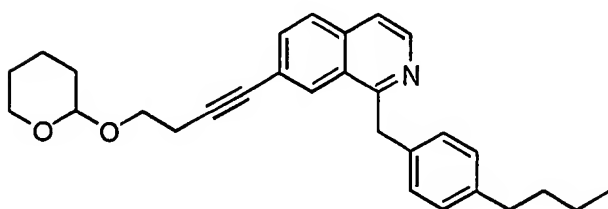
109. 1-(4-ブチルベンジル)-7-(1-エチニル)イソキノリン



110. 1-(4-ブチルベンジル)-7-エチルイソキノリン

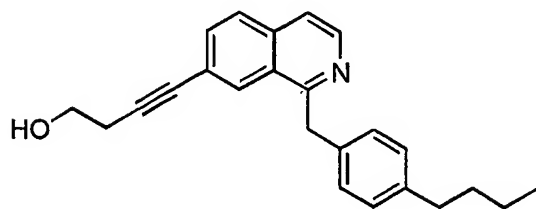


111. 1-(4-ブチルベンジル)-7-[4-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]イソキノリン

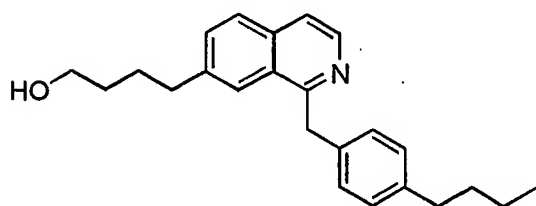


- 84 -

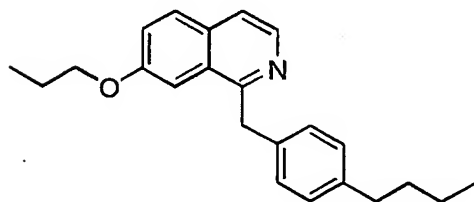
1 1 2 . 4-[1-(4-ブチルベンジル)-7-イソキノリル]-3-ブチン-1-オール



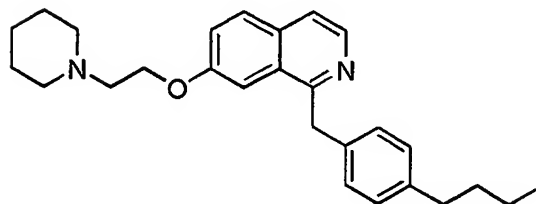
1 1 3 . 4-[1-(4-ブチルベンジル)-7-イソキノリル]-1-ブタノール



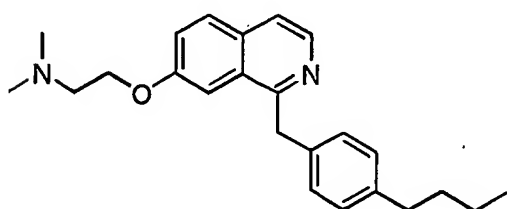
1 1 4 . 1-(4-ブチルベンジル)-7-プロポキシイソキノリン



1 1 5 . 1-(4-ブチルベンジル)-7-(2-ピペリジノエトキシ)イソキノリン

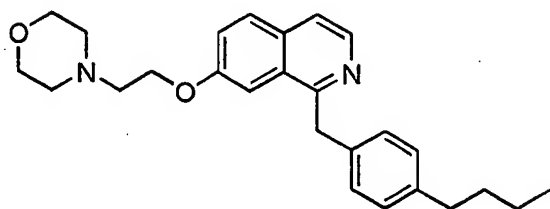


1 1 6 . N-(2-{[1-(4-ブチルベンジル)-7-イソキノリル]オキシ}エチル)-N,N-ジメチルアミン

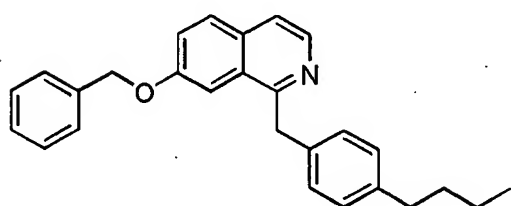


- 85 -

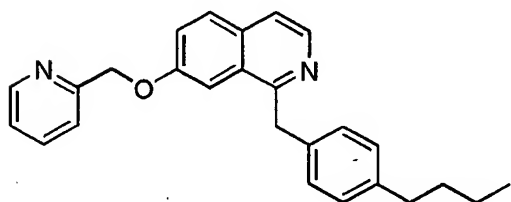
117. 1-(4-ブチルベンジル)-7-イソキノリル(2-モルフォリノエチル)エーテル



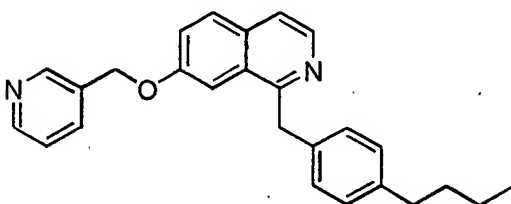
118. 7-(ベンジルオキシ)-1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン



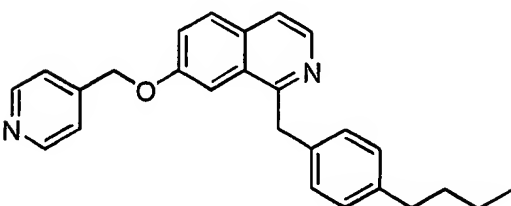
119. 1-(4-ブチルベンジル)-7-(2-ピリジルメトキシ)イソキノリン



120. 1-(4-ブチルベンジル)-7-(3-ピリジルメトキシ)イソキノリン

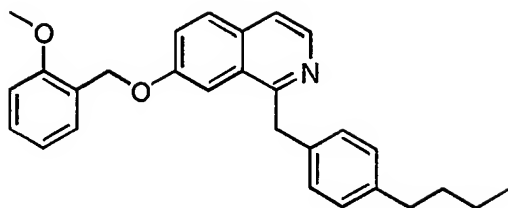


121. 1-(4-ブチルベンジル)-7-(4-ピリジルメトキシ)イソキノリン

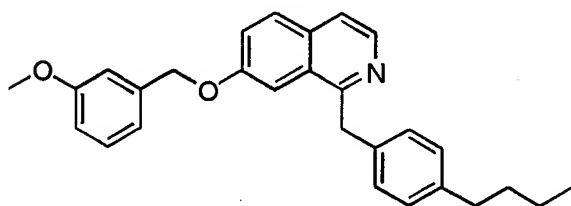


122. 1-(4-ブチルベンジル)-7-[(2-メトキシベンジル)オキシ]イソキノリン

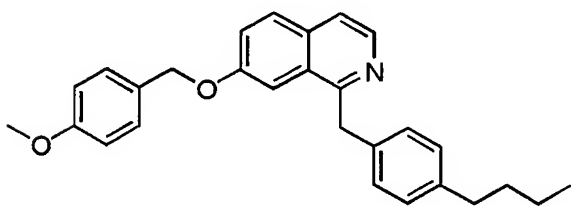
- 86 -



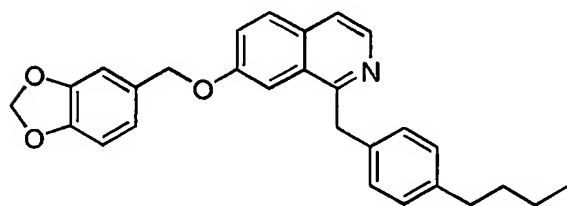
1 2 3. 1-(4-ブチルベンジル)-7-[(3-メトキシベンジル)オキシ]イソキノリン



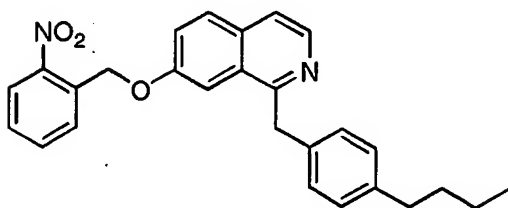
1 2 4. 1-(4-ブチルベンジル)-7-[(4-メトキシベンジル)オキシ]イソキノリン



1 2 5. 7-(1,3-ベンゾオキソール-5-イルメトキシ)-1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン

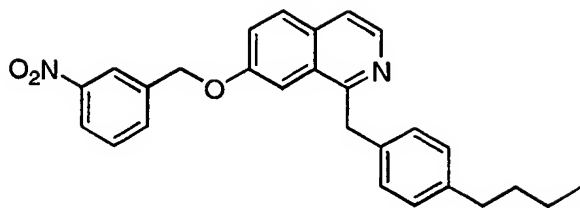


1 2 6. 1-(4-ブチルベンジル)-7-[(2-ニトロベンジル)オキシ]イソキノリン

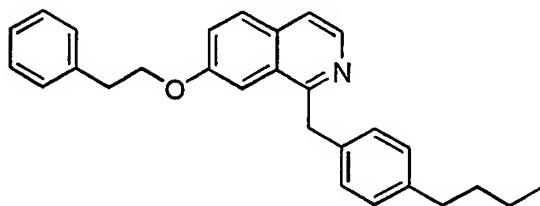


1 2 7. 1-(4-ブチルベンジル)-7-[(3-ニトロベンジル)オキシ]イソキノリン

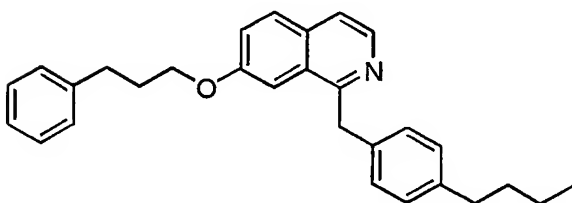
- 87 -



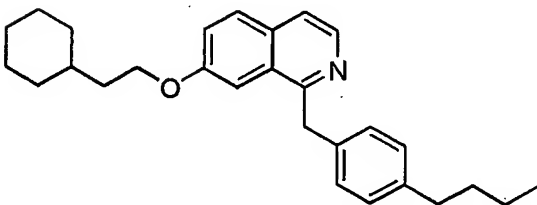
128. 1-(4-ブチルベンジル)-7-(フェネチルオキシ)イソキノリン



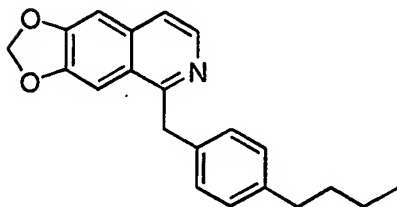
129. 1-(4-ブチルベンジル)-7-(3-フェニルプロポキシ)イソキノリン



130. 1-(4-ブチルベンジル)-7-(2-シクロヘキシルエトキシ)イソキノリン

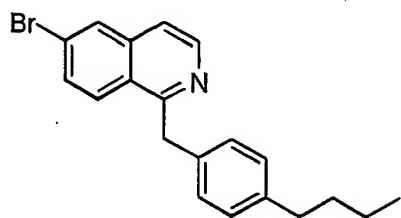


131. 5-(4-ブチルベンジル)[1,3]ジオキサロ[4,5-g]イソキノリン

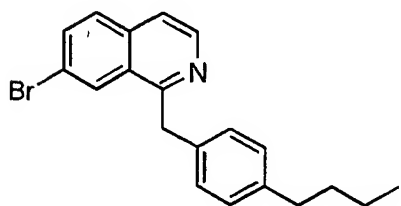


132. 6-ブロモ-1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン

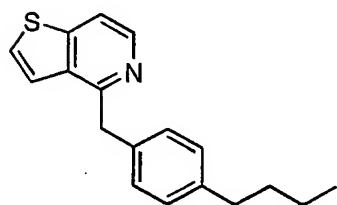
- 88 -



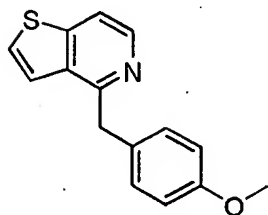
133. 7-ブromo-1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン



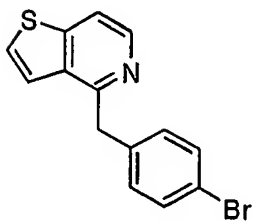
134. 4-(4-ブチルベンジル)チエノ[3,2-c]ピリジン



135. 4-(4-メトキシベンジル)チエノ[3,2-c]ピリジン

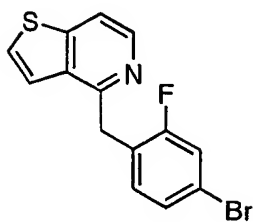


136. 4-(4-ブromoベンジル)チエノ[3,2-c]ピリジン

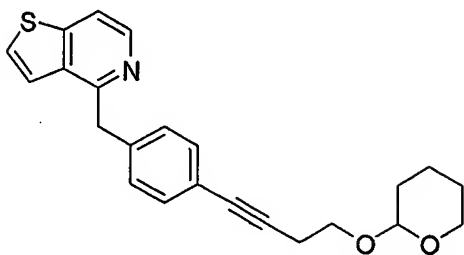


137. 4-(4-ブromo-2-フルオロベンジル)チエノ[3,2-c]ピリジン

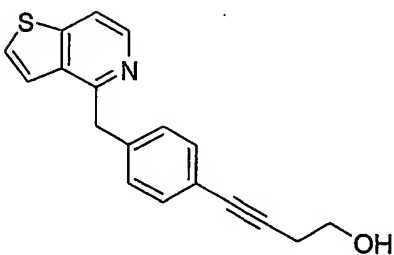
- 89 -



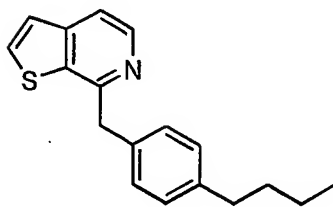
138. 4-[4-[4-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]ベンジル}
チエノ[3,2-c]ピリジン



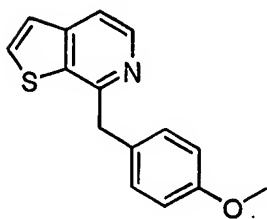
139. 4-[4-(チエノ[3,2-c]ピリジン-4-イルメチル)フェニル]-3-ブチン-1-オ
ール



140. 7-(4-ブチルベンジル)チエノ[2,3-c]ピリジン

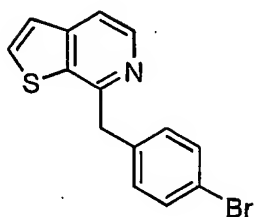


141. 7-(4-メトキシベンジル)チエノ[2,3-c]ピリジン

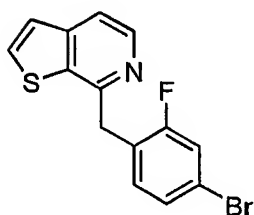
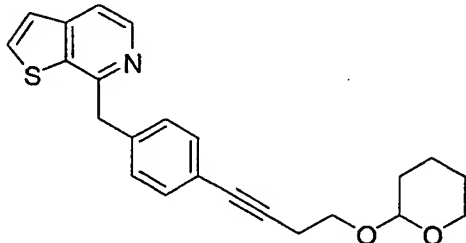
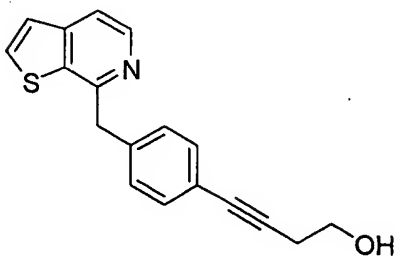


- 90 -

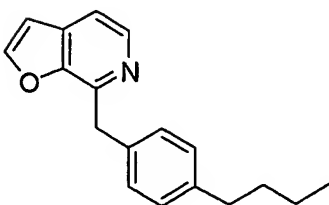
1 4 2 . 7-(4-ブロモベンジル)チエノ[2,3-c]ピリジン



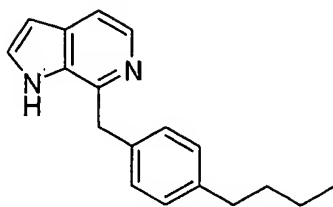
1 4 3 . 7-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)チエノ[2,3-c]ピリジン

1 4 4 . 7-{4-[4-(テトラヒドロ-2H-2-ピラニルオキシ)-1-ブチニル]ベンジル}
チエノ[2,3-c]ピリジン1 4 5 . 4-[4-(チエノ[2,3-c]ピリジン-7-イルメチル)フェニル]-3-ブチン-1-オ
ール

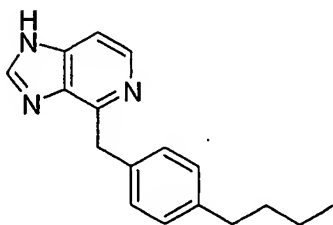
1 4 6 . 7-(4-ブチルベンジル)フロ[2,3-c]ピリジン



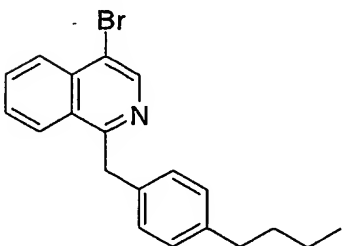
147. 7-(4-ブチルベンジル)-1H-ピロロ[2,3-c]ピリジン



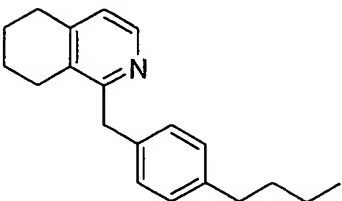
148. 4-(4-ブチルベンジル)-1-イミダゾ[4,5-c]ピリジン



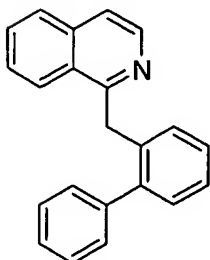
149. 4-ブromo-1-(4-ブチルベンジル)イソキノリン



150. 1-(4-ブチルベンジル)-5,6,7,8-テトラヒドロイソキノリン

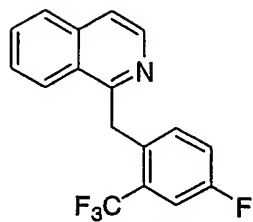


151. 1-[2-フェニルベンジル]イソキノリン

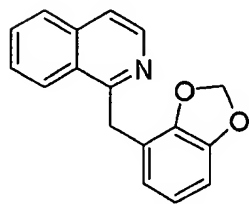


152. 1-[4-フルオロ-2-(トリフルオロメチル)ベンジル]イソキノリン

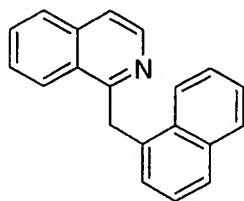
- 92 -



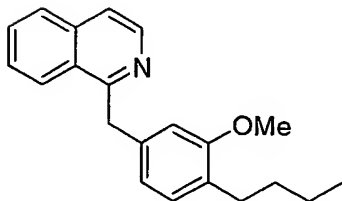
1 5 3 . 1-(1,3-ベンゾジオキソール-4-イルメチル)イソキノリン



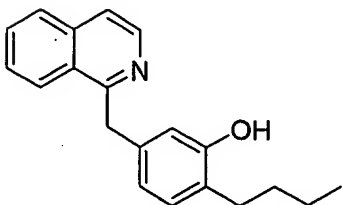
1 5 4 . 1-(1-ナフチルメチル)イソキノリン



1 5 5 . 1-(4-ブチル-3-メトキシベンジル)イソキノリン

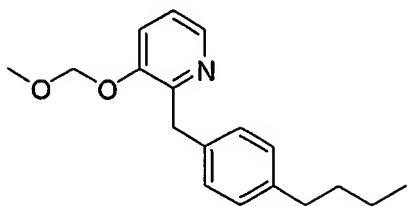


1 5 6 . 2-ブチル-5-(1-イソキノリルメチル)フェノール

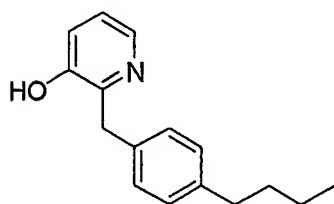


1 5 7 . 2-(4-ブチルベンジル)-3-(メトキシメトキシ)ピリジン

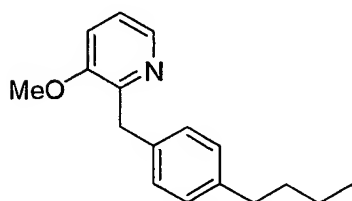
- 93 -



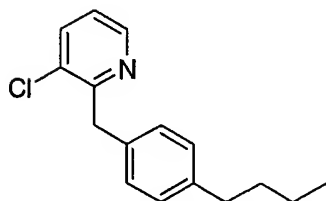
158. 2-(4-ブチルベンジル)-3-ピリジノール



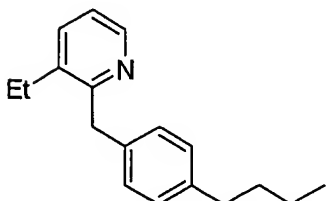
159. 2-(4-ブチルベンジル)-3-メトキシピリジン



160. 2-(4-ブチルベンジル)-3-クロロピリジン

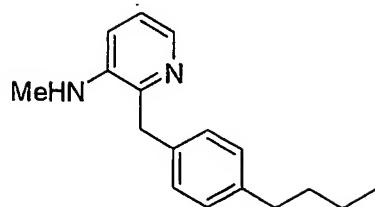


161. 2-(4-ブチルベンジル)-3-エチルピリジン

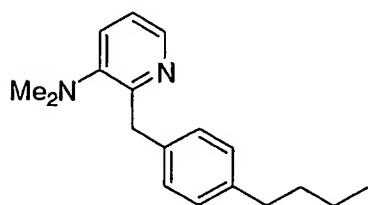


162. N-[2-(4-ブチルベンジル)-3-ピリジル]-N-メチルアミン

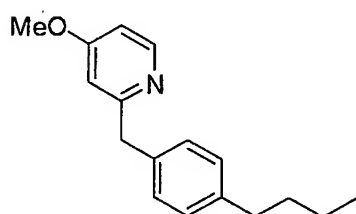
- 94 -



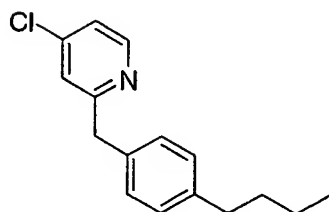
1 6 3 . N-[2-(4-ブチルベンジル)-3 ピリジル]-N,N-ジメチルアミン



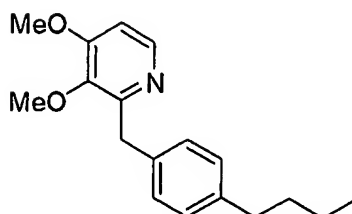
1 6 4 . 2-(4-ブチルベンジル)-4-メトキシピリジン



1 6 5 . 2-(4-ブチルベンジル)-4-クロロピリジン

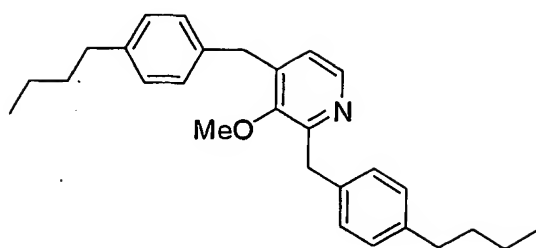


1 6 6 . 2-(4-ブチルベンジル)-3,4-ジメトキシピリジン

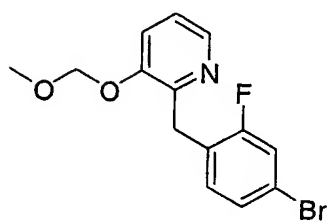


1 6 7 . 2,4-ジ(4-ブチルベンジル)-3-メトキシピリジン

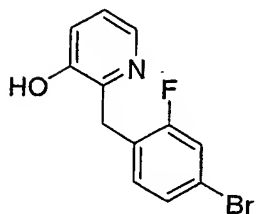
- 95 -



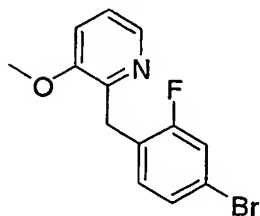
168. 2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-(メトキシメトキシ)ピリジン



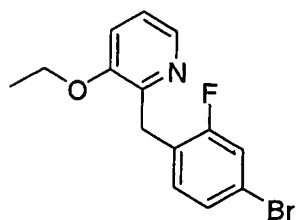
169. 2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-ピリジノール



170. 2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-メトキシピリジン

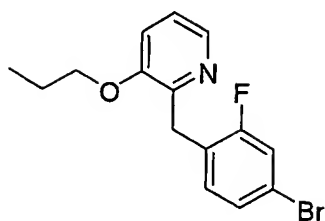


171. 2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-エトキシピリジン

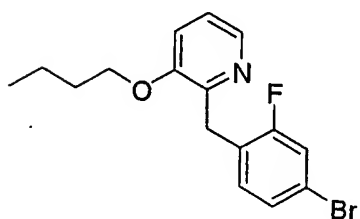


172. 2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-プロポキシピリジン

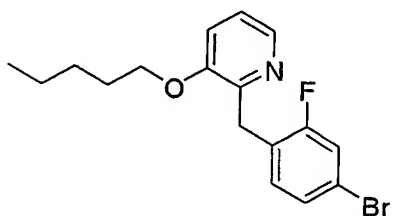
- 96 -



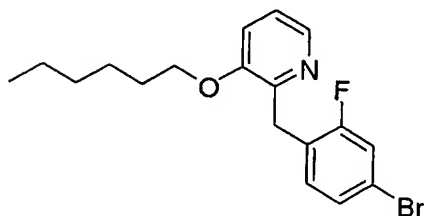
173. 2-(4-ブromo-2-フルオロベンジル)-3-ブトキシピリジン



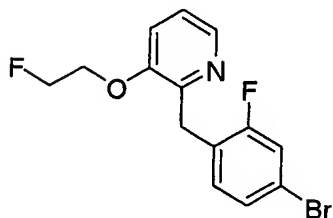
174. 2-(4-ブromo-2-フルオロベンジル)-3-(ペンチルオキシ)ピリジン



175. 2-(4-ブromo-2-フルオロベンジル)-3-(ヘキシルオキシ)ピリジン

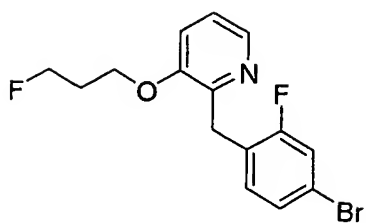


176. 2-(4-ブromo-2-フルオロベンジル)-3-(2-フルオロエトキシ)ピリジン

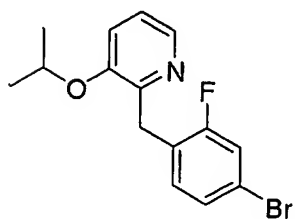


177. 2-(4-ブromo-2-フルオロベンジル)-3-(3-フルオロプロポキシ)ピリジン

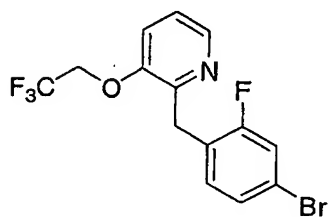
- 97 -



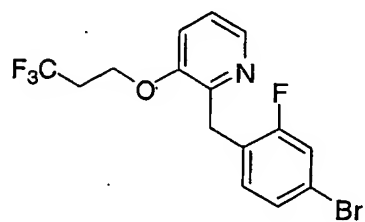
178. 2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-イソプロポキシピリジン



179. 2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-(2,2,2-トリフルオロエトキシ)ピリジン



180. 2-(4-ブロモ-2-フルオロベンジル)-3-(3,3,3-トリフルオロプロポキシ)ピリジン

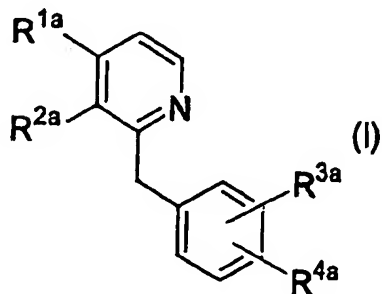


産業上の利用の可能性

GPI アンカー蛋白質の真菌細胞壁への輸送を阻害する化合物が、簡単な Binding assay によりスクリーニング可能となった。

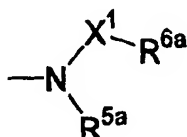
請求の範囲

1. 抗真菌作用を有する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (1). 下記 (a) から (e) のいずれかに記載の DNA によりコードされる蛋白質と、被検試料及び該蛋白質に結合活性を有する標識化合物とを接触させる工程、
 - (a) 配列番号：2、4、6、28、40 または 59 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA
 - (b) 配列番号：1、3、5、27、39、41、54 または 58 に記載の塩基配列を含む DNA
 - (c) 配列番号：1、3、5、27、39、41、54 または 58 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA
 - (d) 配列番号：2、4、6、28、40 または 59 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が付加、欠失、置換および／または挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA
 - (e) 配列番号：29 及び 31 あるいは配列番号：29 及び 30 をプライマーとして増幅される DNA
 - (2). 該蛋白質に結合する標識化合物を検出する工程、
 - (3). 該蛋白質に結合する標識化合物を減少させる被検試料を選択する工程、を含む方法。
2. 該蛋白質に結合活性を有する標識化合物が、一般式 (I)



- 100 -

[式中 R^{1a} および R^{2a} は同一または相異なってそれぞれ水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、置換されてもよい C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、置換されてもよい C_{1-6} アルコキシ基、または式



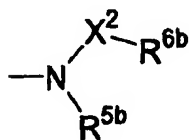
(式中 X^1 は単結合、カルボニル基、または式 $-\text{S}(O)_2-$ で表わされる基を意味する；

R^{5a} および R^{6a} は同一または相異なって、水素原子、または置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基を示す。また、 R^{1a} と R^{2a} は一緒になって、置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいピロール環、置換されていてもよいチオフェン環、置換されていてもよいフラン環、置換されていてもよいピリダジン環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいピラジン環、置換されていてもよいイミダゾール環、置換されていてもよいオキサゾール環、置換されていてもよいチアゾール環、置換されていてもよいピラゾール環、置換されていてもよいイソオキサゾール環、置換されていてもよいイソチアゾール環、置換されていてもよいシクロヘキサン環、および置換されていてもよいシクロペンタン環からなる群から選ばれる縮合環を形成してもよい；

R^{3a} 、および R^{4a} は同一または相異なってそれぞれ、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、ホルミル基、ヒドロキシイミノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、式 $-\text{C}(O)\text{NR}^{7a}\text{R}^{7b}$ (式中、 R^{7a} および R^{7b} は同一または相異なってそれぞれ水素原子、または C_{1-6} アルキル基を意味する)、式 $-\text{CO}_2\text{R}^{7a}$ (式中、 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する)、式 $-\text{S}(O)_n\text{R}^{7a}$ (式

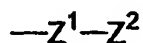
- 101 -

中、 n は 0 ないし 2 の整数を意味する。 R^{7a} は前記定義と同意義を意味する)、式
 $-S(O)_2NR^{7a}R^{7b}$ (式中、 R^{7a} および R^{7b} は前記定義と同意義を意味する)、式



(式中 X^2 は単結合、カルボニル基、または式 $-S(O)_2-$ で表わされる基を意味する；

R^{5b} および R^{6b} は同一または相異なっていて、水素原子、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基、または置換されていてもよい C_{6-14} アリール基を意味する) で表わされる基、または式

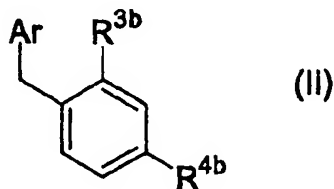


(式中、 Z^1 は単結合、酸素原子、ビニレン基、またはエチニレン基を意味する；

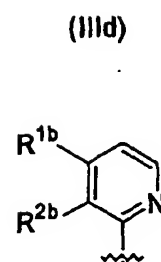
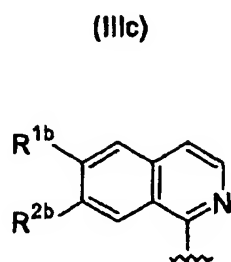
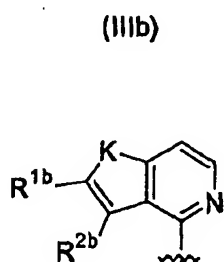
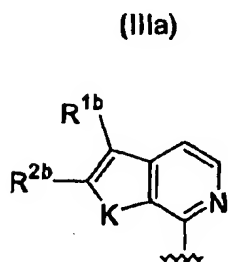
Z^2 は単結合、または 0 ないし 4 個の置換基で置換されてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基を意味する。 R^{3a} と R^{4a} は一緒になって、メチレンジオキシ基、または 1,2-エチレンジオキシ基を意味してもよく、また R^{3a} と R^{4a} は一緒になって、置換されていてもよいベンゼン環、置換されていてもよいピリジン環、置換されていてもよいピロール環、置換されていてもよいチオフェン環、置換されていてもよいフラン環、置換されていてもよいピリダジン環、置換されていてもよいピリミジン環、置換されていてもよいピラジン環、置換されていてもよいイミダゾール環、置換されていてもよいオキサゾール環、置換されていてもよいチアゾール環、置換されていてもよいピラゾール環、置換されていてもよいイソオキサゾール環、置換されていてもよいイソチアゾール環、置換されていてもよいシクロヘキサン環および置換されていてもよいシクロペンタン環からなる群から選ばれる縮合環の形成を意味してもよい。ただし、 R^{1a} および R^{2a} がともに

水素原子を意味する場合は除く。)で示される化合物である、請求項1に記載の方法。

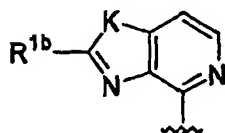
3. 該蛋白質に結合活性を有する標識化合物が、一般式(II)



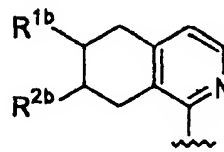
〔式中 Ar は下記式 (IIIa) - (IIIf) からなる群



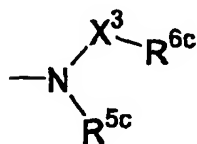
(IIIe)



(IIIf)



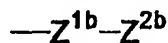
(式中、K は硫黄原子、酸素原子、または式 -NH- で表わされる基を意味する；
R^{1b}、R^{2b} は同一または相異なってそれぞれ水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、置換されていてもよい C₁₋₆ アルキル基、置換されていてもよい C₁₋₆ アルコキシ基、式



(式中 X³ は単結合、カルボニル基、または式 -S(O)₂- で表わされる基を意味する；

R^{6c} および R^{6c} は同一または相異なっていて、水素原子、置換されていてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基、または式 $-X^4-R^{8a}$ (式中、 X^4 は、単結合、酸素原子、または硫黄原子を意味する； R^{8a} は C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、 C_{3-8} シクロアルキル基、または C_{3-8} シクロアルケニル基を意味する) で表わされる基を示す。また、 R^{1b} 、 R^{2b} は一緒になってメチレンジオキシ基、または 1,2-エチレンジオキシ基を形成してもよい。) から選ばれる置換基を意味する；

R^{3b} 、および R^{4b} は同一または相異なっていてそれぞれ、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、ホルミル基、ヒドロキシイミノ基、トリフルオロメチル基、トリフルオロメトキシ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルコキシ基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{2-6} アルキニル基、または式、

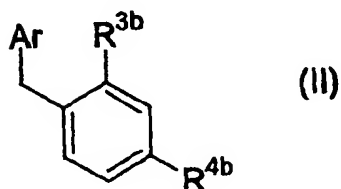


(式中、 Z^{1b} は単結合、ビニレン基、またはエチニレン基を意味する；

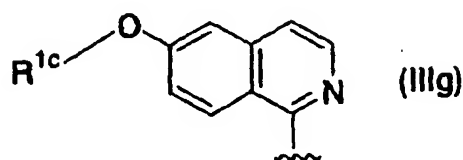
Z^{2b} は単結合、または 0 ないし 4 個の置換基で置換されてもよい C_{1-6} アルキル基を意味する) で表わされる基を意味する。；

ただし (1) Ar が、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子である前記式 (IIId) で表わされる場合、(2) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、メトキシ基、水酸基、メチル基、ベンジルオキシ基、またはハロゲン原子であり、 Ar が、 R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子またはメトキシ基を意味する前記式 (IIIc) で表わされる場合、(3) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、水酸基、メトキシ基、またはベンジルオキシ基であり、 Ar が、 R^{1b} および R^{2b} がともに水酸基またはベンジルオキシ基を意味する前記式 (IIIc) で表わされる場合、または (4) Ar が、 R^{1b} が水素原子で R^{2b} がホルミル基、ヒドロキシメチル基またはメトキシカルボニル基である前記式 (IIId) で表わされる場合を除く。) で示される化合物である、請求項 1 に記載の方法。

4. 該蛋白質に結合活性を有する標識化合物が、一般式(II)

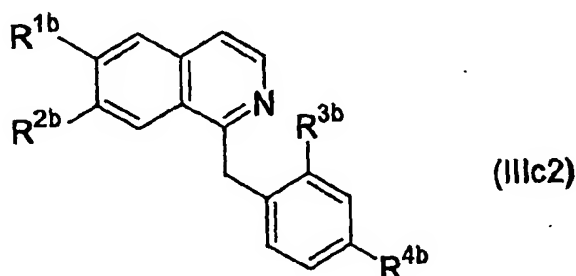


〔式中 Ar が式、



(式中、R^{1c} が水素原子、置換されてもよい C₁₋₆ アルキル基、ベンジル基を意味する。) で表わされ、かつ R^{3b} が水素原子を意味する場合を除いた〕で表される化合物である、請求項 1 に記載の方法。

5. 該蛋白質に結合活性を有する標識化合物が、一般式(IIIc2)

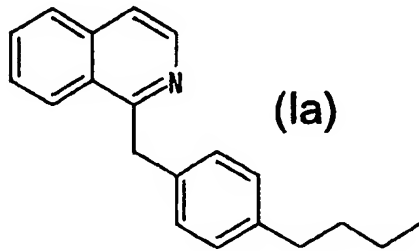


〔式中 R^{1b}、R^{2b} は前記定義と同意義を意味する。ただし、(1) R^{1b} が式 R^{1c}-O- (式中、R^{1c} は前記定義と同意義を意味する) で表わされる基であり、R^{2b} が水素原子であり、R^{3b} が水素原子を意味する場合、(2) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、メトキシ基、水酸基、メチル基、ベンジルオキシ基、またはハロゲン原子であり、R^{1b} および R^{2b} がともに水素原子またはメトキシ基を意味する場合、または(3) R^{3b} または R^{4b} の少なくとも一方が水素原子を示し、もう一方が水素原子、水酸基、メトキシ基、またはベンジルオキシ

- 105 -

基であり、 R^{1b} および R^{2b} がともに水酸基またはベンジルオキシ基を意味する場合を除く。〕で表される化合物である、請求項 1 に記載の方法。

6. 該蛋白質に結合活性を有する標識化合物が、式(Ia)

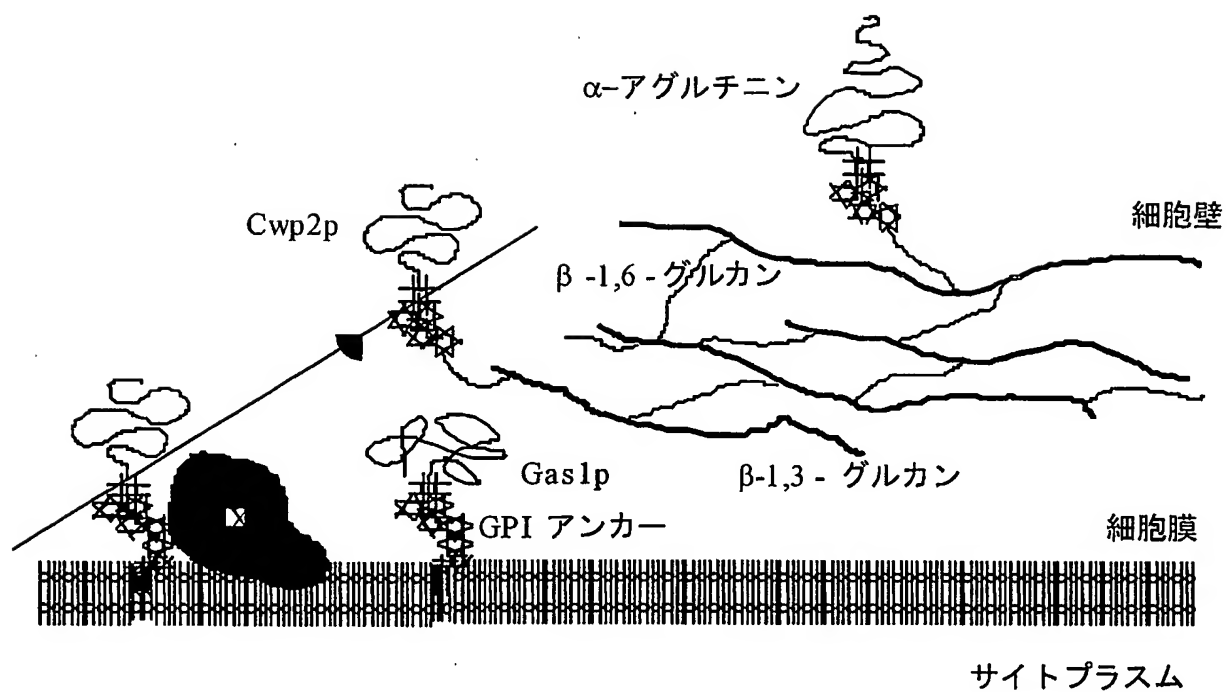


で表される化合物である、請求項 1 に記載の方法。

7. さらに、(4)選択された被検試料が、GPI アンカー蛋白質の細胞壁への輸送過程を阻害するか否か、または、GPI アンカー蛋白質の真菌表層への発現を阻害するか否かを検定する工程、を含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

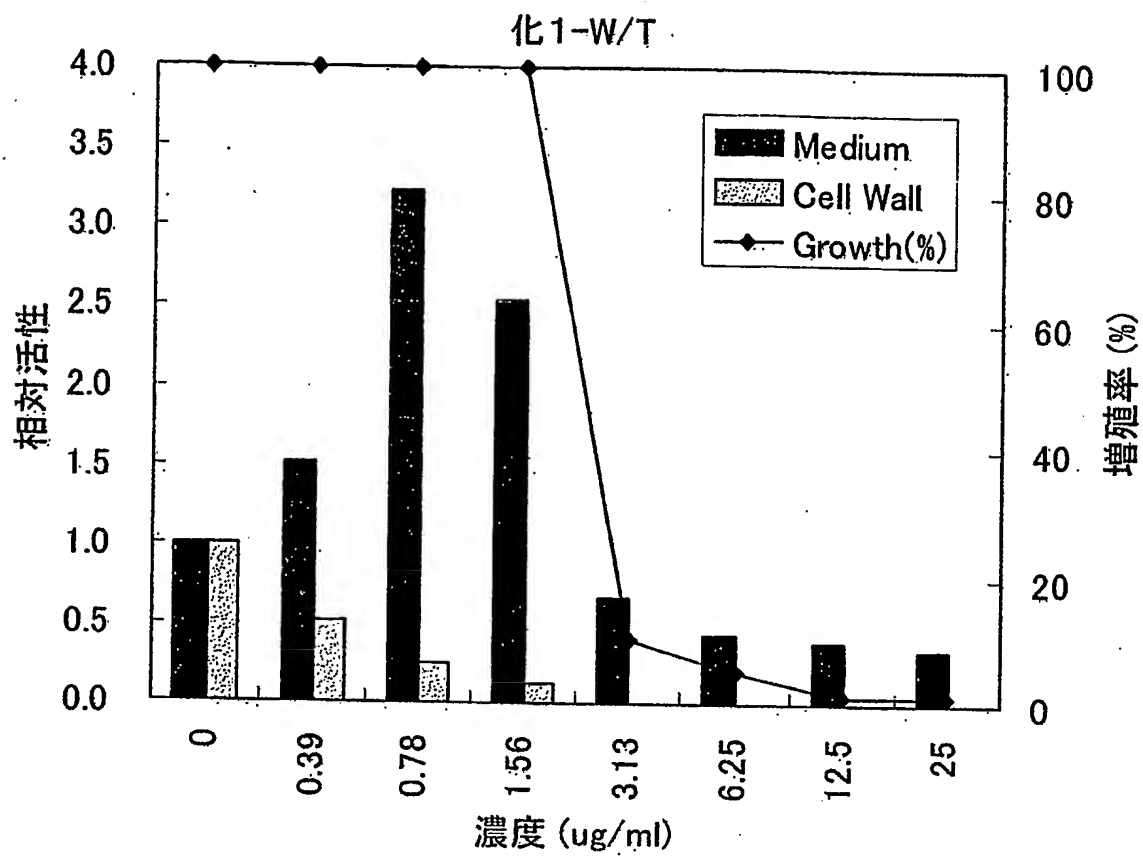
1 / 10

図 1



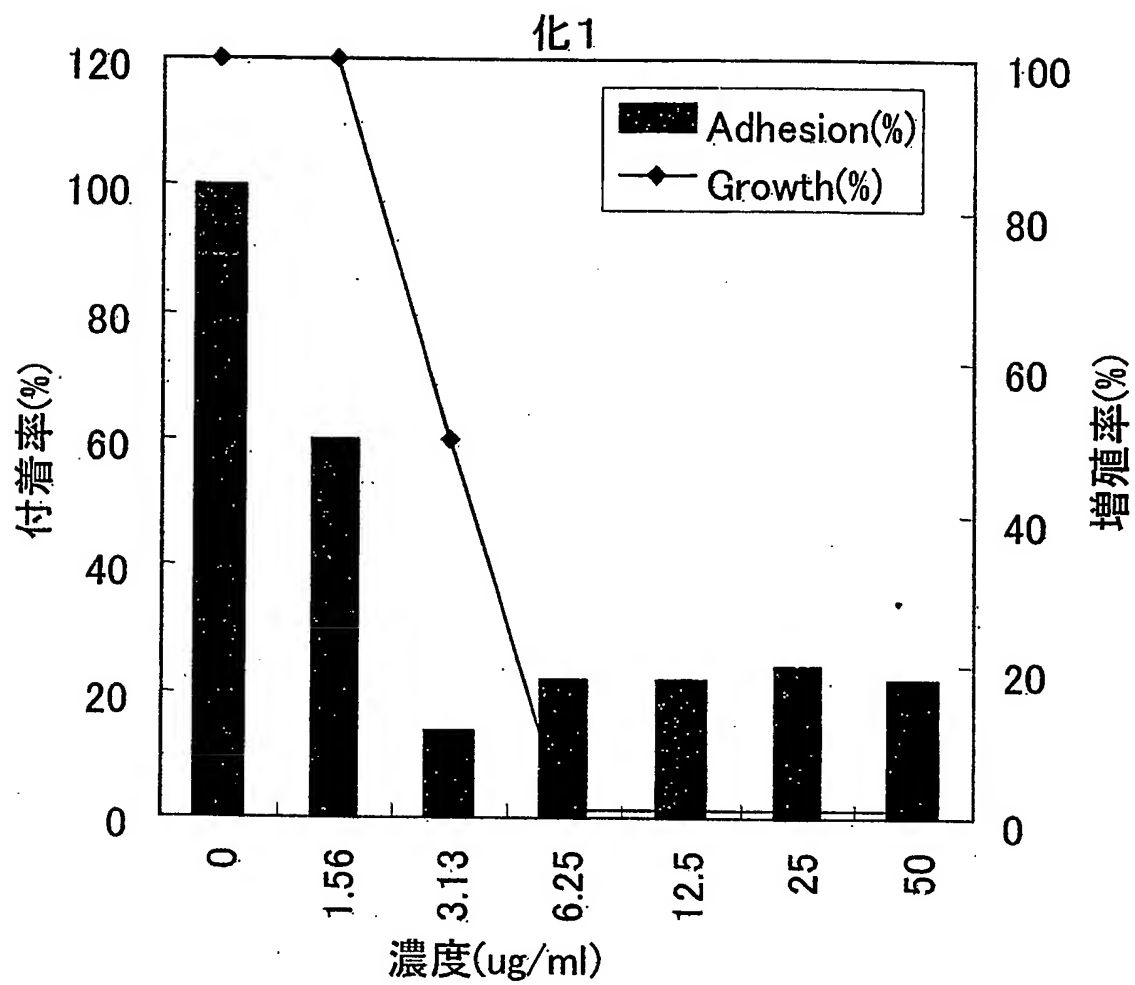
2/10

図 2



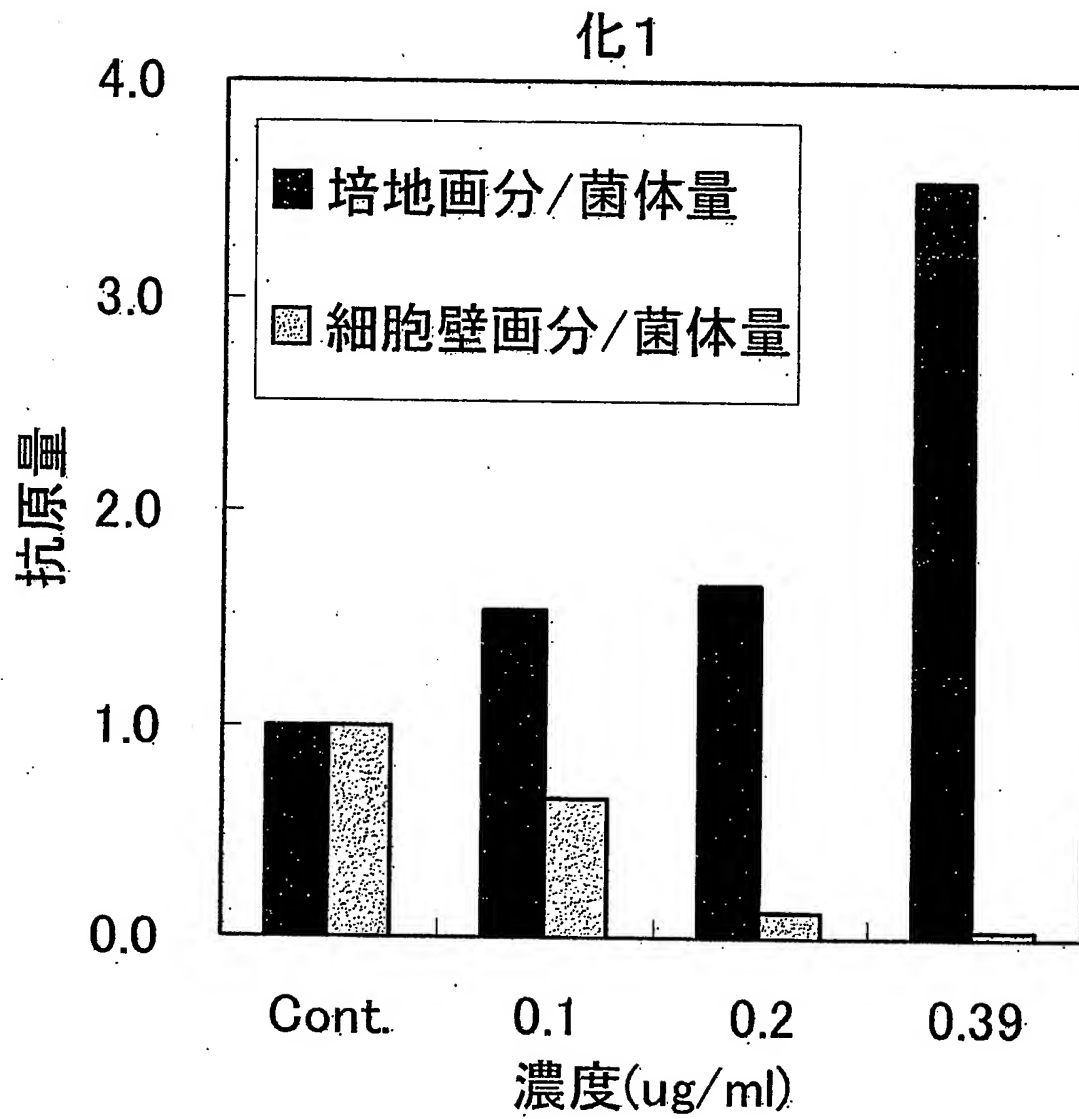
3 / 10

図 3



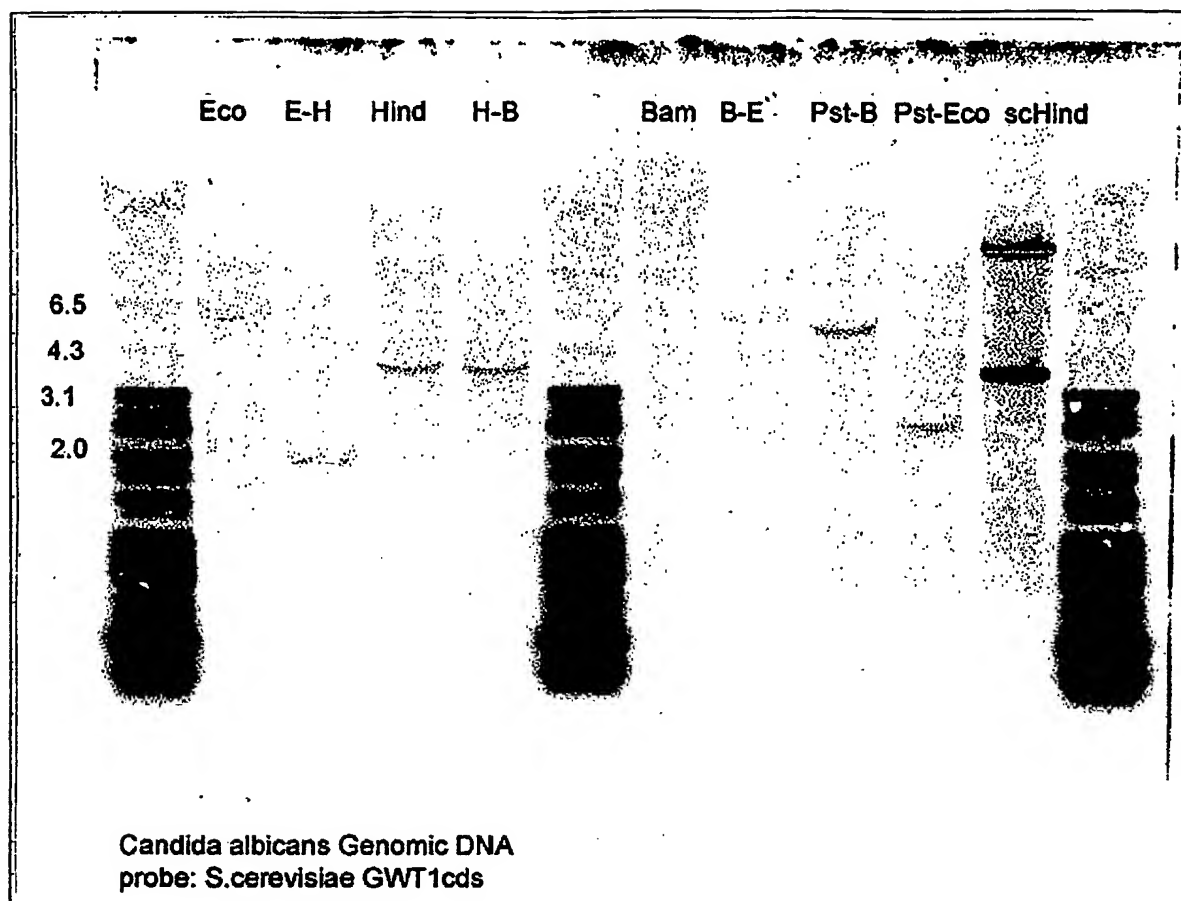
4/10

図 4



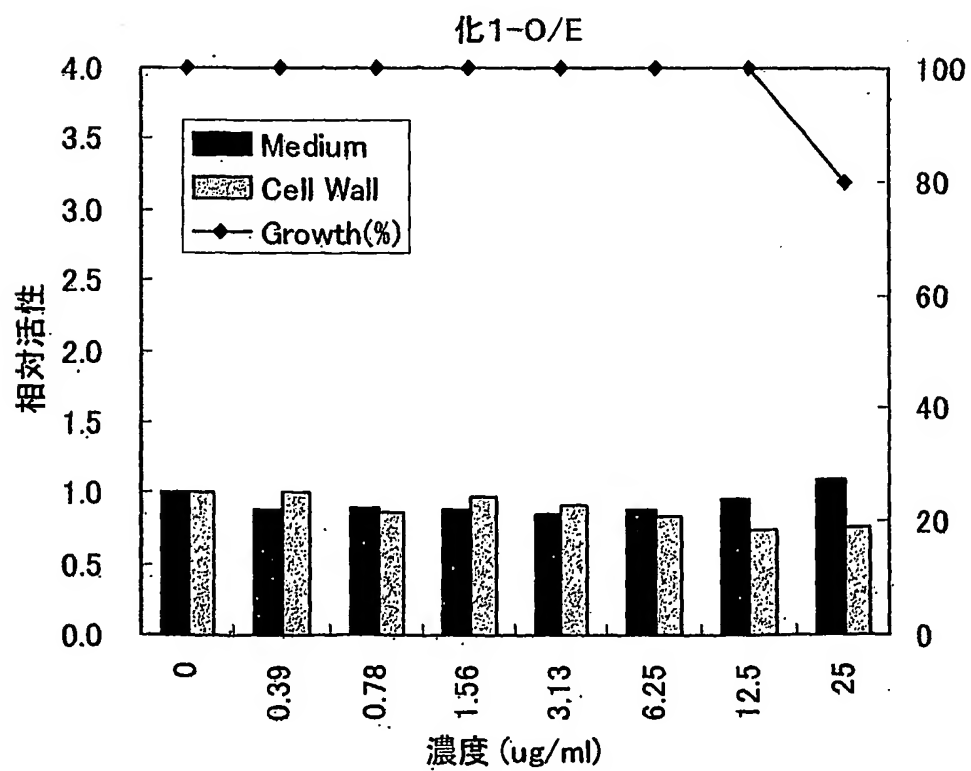
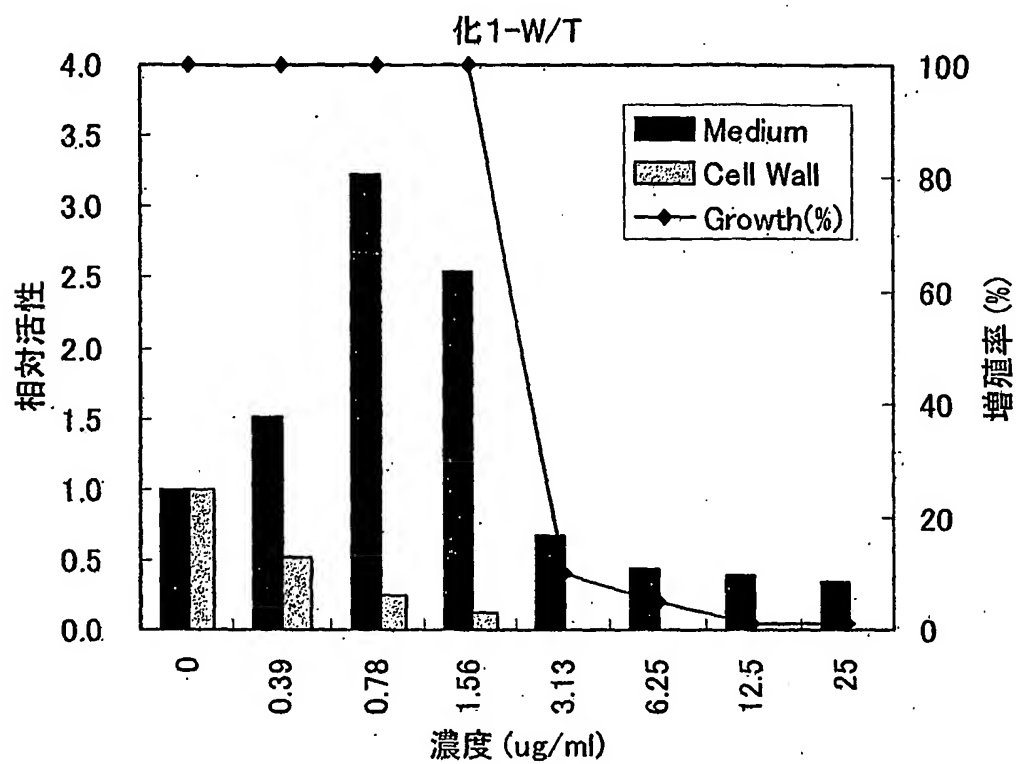
5 / 10

図 5



6 / 10

図 6



7 / 10

図 7

<F-domain>

S. cerevisiae

C. albicans

S. pombe

ILAVDF	PI	FP	RR	F	AKVETWG	TS	L	MDLGVGS	F
ILAVDF	PI	FP	RR	F	AKVETWG	TS	M	MDLGVGS	F
ILAVDF	TL	FP	RR	Y	AKVETWG	TS	L	MDLGVGS	F

<R-domain>

S. cerevisiae

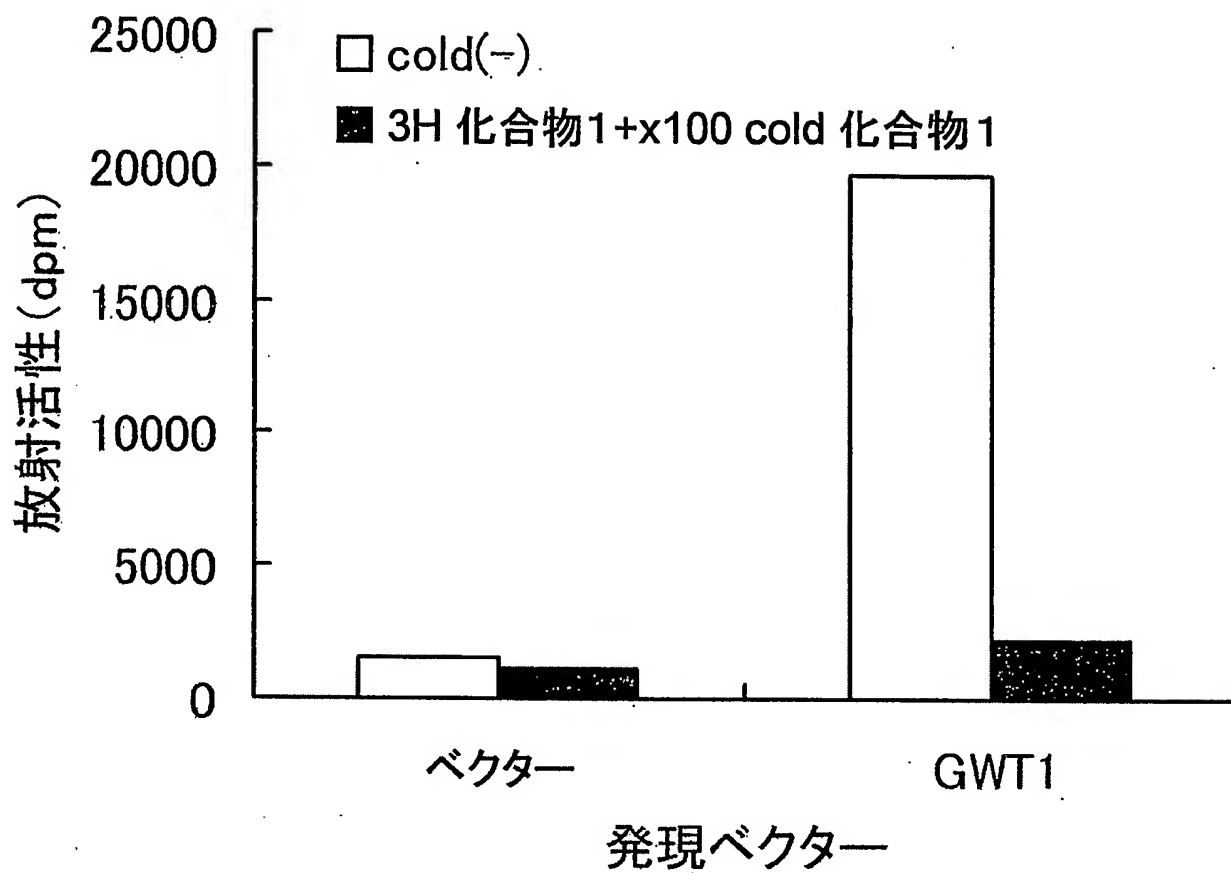
C. albicans

S. pombe

YQEH	VT	EYG	V	HWNFF	I	T
YQEH	ET	EYG	I	HWNFF	F	T
YQEH	VS	EYG	M	HWNFF	F	T

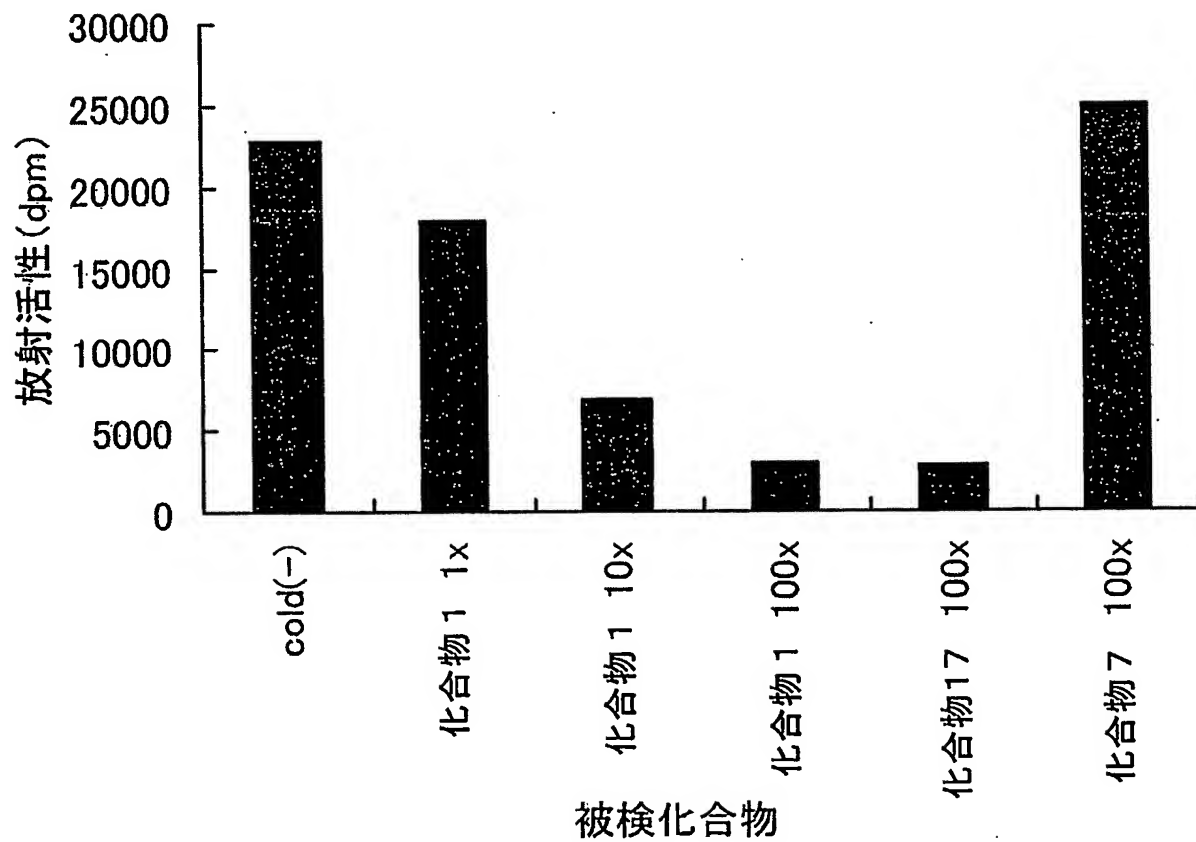
8/10

図 8



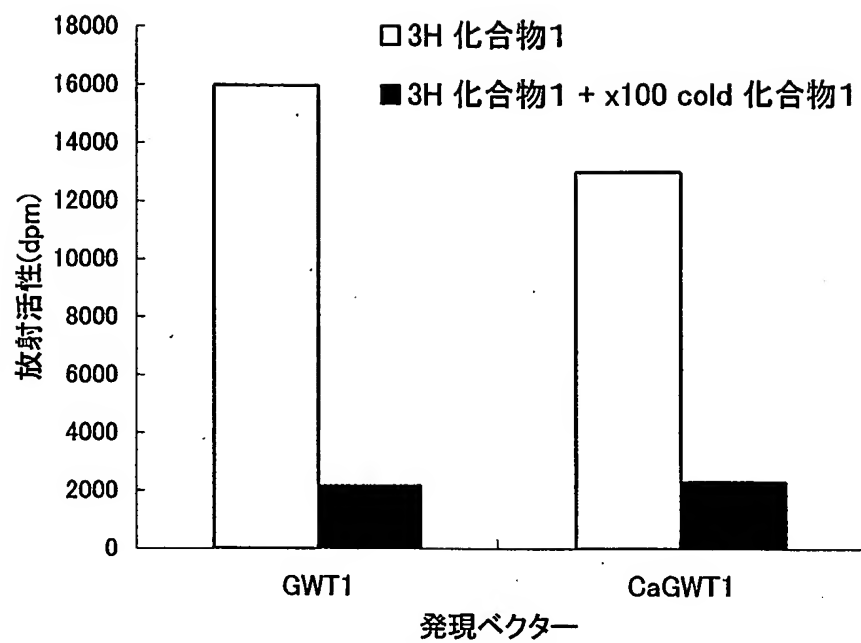
9 / 10

図 9



10/10

図 10



1/83

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> Method for a screening of compounds which inhibit fungal cell wall synthesis

<130> E1-A0102P

<150> JP 2001-401947

<151> 2001-12-28

<160> 67

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1497

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1494)

<400> 1

2/83

atg gca aca gta cat cag aag aat atg tcg act tta aaa cag aga aaa	48
Met Ala Thr Val His Gln Lys Asn Met Ser Thr Leu Lys Gln Arg Lys	
1 5 10 15	
gag gac ttt gtg aca ggg ctc aat ggc ggt tct ata aca gaa att aac	96
Glu Asp Phe Val Thr Gly Leu Asn Gly Gly Ser Ile Thr Glu Ile Asn	
20 25 30	
gca gtg aca tca att gct ttg gta act tac ata tca tgg aac tta ttg	144
Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu Val Thr Tyr Ile Ser Trp Asn Leu Leu	
35 40 45	
aaa aat tcc aac ctt atg cct cct ggc att tcc agc gtg caa tac ata	192
Lys Asn Ser Asn Leu Met Pro Pro Gly Ile Ser Ser Val Gln Tyr Ile	
50 55 60	
att gat ttt gca ttg aac tgg gtt gct ttg ctt cta tct att act att	240
Ile Asp Phe Ala Leu Asn Trp Val Ala Leu Leu Leu Ser Ile Thr Ile	
65 70 75 80	
tat gct agt gaa cca tac ctt cta aac acg cta ata ctg tta cct tgt	288
Tyr Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Leu Asn Thr Leu Ile Leu Leu Pro Cys	
85 90 95	
ttg ctc gca ttc ata tat gga aaa ttt act agc tcg agt aaa cct tct	336
Leu Leu Ala Phe Ile Tyr Gly Lys Phe Thr Ser Ser Ser Lys Pro Ser	
100 105 110	
aat cca ata tac aat aaa aaa aaa atg att aca cag cgg ttc caa cta	384
Asn Pro Ile Tyr Asn Lys Lys Lys Met Ile Thr Gln Arg Phe Gln Leu	
115 120 125	
gaa aaa aag ccg tat att act gcg tat cgt ggt ggg atg ctt att ctg	432
Glu Lys Lys Pro Tyr Ile Thr Ala Tyr Arg Gly Gly Met Leu Ile Leu	

3/83

130	135	140	
act gct att gcc atc ttg gct gta gat ttt cca att ttc cca agg agg			480
Thr Ala Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro Arg Arg			
145	150	155	160
ttt gcc aag gtg gaa act tgg ggg aca tcc ctg atg gat ctt ggt gta			528
Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val			
	165	170	175
gga tca ttc gtt ttc agt aac ggt att gtt tct tct agg gca ctg ttg			576
Gly Ser Phe Val Phe Ser Asn Gly Ile Val Ser Ser Arg Ala Leu Leu			
	180	185	190
aaa aac cta agc ttg aag agt aaa ccc agc ttc tta aaa aat gca ttt			624
Lys Asn Leu Ser Leu Lys Ser Lys Pro Ser Phe Leu Lys Asn Ala Phe			
	195	200	205
aat gcc tta aaa tca gga gga act cta ttg ttc cta gga ttg ctg agg			672
Asn Ala Leu Lys Ser Gly Gly Thr Leu Leu Phe Leu Gly Leu Leu Arg			
	210	215	220
ttg ttt ttt gta aaa aat ttg gaa tat caa gaa cat gtc aca gaa tat			720
Leu Phe Phe Val Lys Asn Leu Glu Tyr Gln Glu His Val Thr Glu Tyr			
225	230	235	240
ggg gtt cat tgg aat ttt ttt atc acc cta tca ttg ttg cca ctt gta			768
Gly Val His Trp Asn Phe Phe Ile Thr Leu Ser Leu Leu Pro Leu Val			
	245	250	255
ttg acc ttt att gat ccc gtc aca aga atg gtt cca cgc tgc tca att			816
Leu Thr Phe Ile Asp Pro Val Thr Arg Met Val Pro Arg Cys Ser Ile			
	260	265	270
gca ata ttc att tca tgc att tat gaa tgg cta ctt tta aag gac gat			864

4/83

Ala Ile Phe Ile Ser Cys Ile Tyr Glu Trp Leu Leu Leu Lys Asp Asp	
275	280
285	
cgc act tta aac ttt tta att ttg gct gat aga aat tgt ttc ttc agt	912
Arg Thr Leu Asn Phe Leu Ile Leu Ala Asp Arg Asn Cys Phe Phe Ser	
290	295
300	
gct aat aga gaa ggc atc ttc tca ttt cta ggt tat tgc tcg att ttt	960
Ala Asn Arg Glu Gly Ile Phe Ser Phe Leu Gly Tyr Cys Ser Ile Phe	
305	310
315	320
ctt tgg ggc caa aac acg gga ttt tac ttg ttg gga aat aaa cca act	1008
Leu Trp Gly Gln Asn Thr Gly Phe Tyr Leu Leu Gly Asn Lys Pro Thr	
325	330
335	
tta aac aat ctt tat aag cct tct acg caa gac gta gtt gca gca tca	1056
Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Gln Asp Val Val Ala Ala Ser	
340	345
350	
aag aag tct tcg act tgg gac tat tgg act tca gta acc cca tta agt	1104
Lys Lys Ser Ser Thr Trp Asp Tyr Trp Thr Ser Val Thr Pro Leu Ser	
355	360
365	
ggc ctc tgt ata tgg agt aca att ttt ctt gtt atc agc cag ttg gtt	1152
Gly Leu Cys Ile Trp Ser Thr Ile Phe Leu Val Ile Ser Gln Leu Val	
370	375
380	
ttt caa tac cat cct tat agt gtt tca aga agg ttt gct aac tta cca	1200
Phe Gln Tyr His Pro Tyr Ser Val Ser Arg Arg Phe Ala Asn Leu Pro	
385	390
395	400
tat act ttg tgg gtc att act tat aat tta cta ttt ttg act ggg tac	1248
Tyr Thr Leu Trp Val Ile Thr Tyr Asn Leu Leu Phe Leu Thr Gly Tyr	
405	410
415	

5/83

tgc ttg act gac aaa att ttc ggt aat tct tcg gaa tat tat aaa gtt 1296
 Cys Leu Thr Asp Lys Ile Phe Gly Asn Ser Ser Glu Tyr Tyr Lys Val
 420 425 430
 gcc gaa tgc ttg gaa tca atc aac tcc aat ggg ttg ttt tta ttt ttg 1344
 Ala Glu Cys Leu Glu Ser Ile Asn Ser Asn Gly Leu Phe Leu Phe Leu
 435 440 445
 ttg gca aat gtc tct act ggt tta gtc aat atg tct atg gtc acg ata 1392
 Leu Ala Asn Val Ser Thr Gly Leu Val Asn Met Ser Met Val Thr Ile
 450 455 460
 gat tct tca ccc tta aaa tca ttc ctg gtt ttg ttg gca tac tgc tca 1440
 Asp Ser Ser Pro Leu Lys Ser Phe Leu Val Leu Leu Ala Tyr Cys Ser
 465 470 475 480
 ttc ata gct gtc ata tcg gtt ttc ttg tat aga aaa aga ata ttc att 1488
 Phe Ile Ala Val Ile Ser Val Phe Leu Tyr Arg Lys Arg Ile Phe Ile
 485 490 495
 aag cta taa 1497
 Lys Leu

<210> 2

<211> 498

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

Met Ala Thr Val His Gln Lys Asn Met Ser Thr Leu Lys Gln Arg Lys

6/83

1	5	10	15
Glu Asp Phe Val Thr Gly Leu Asn Gly Gly Ser Ile Thr Glu Ile Asn			
20	25	30	
Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu Val Thr Tyr Ile Ser Trp Asn Leu Leu			
35	40	45	
Lys Asn Ser Asn Leu Met Pro Pro Gly Ile Ser Ser Val Gln Tyr Ile			
50	55	60	
Ile Asp Phe Ala Leu Asn Trp Val Ala Leu Leu Leu Ser Ile Thr Ile			
65	70	75	80
Tyr Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Leu Asn Thr Leu Ile Leu Leu Pro Cys			
85	90	95	
Leu Leu Ala Phe Ile Tyr Gly Lys Phe Thr Ser Ser Ser Lys Pro Ser			
100	105	110	
Asn Pro Ile Tyr Asn Lys Lys Lys Met Ile Thr Gln Arg Phe Gln Leu			
115	120	125	
Glu Lys Lys Pro Tyr Ile Thr Ala Tyr Arg Gly Gly Met Leu Ile Leu			
130	135	140	
Thr Ala Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro Arg Arg			
145	150	155	160
Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val			
165	170	175	
Gly Ser Phe Val Phe Ser Asn Gly Ile Val Ser Ser Arg Ala Leu Leu			
180	185	190	
Lys Asn Leu Ser Leu Lys Ser Lys Pro Ser Phe Leu Lys Asn Ala Phe			
195	200	205	
Asn Ala Leu Lys Ser Gly Gly Thr Leu Leu Phe Leu Gly Leu Leu Arg			

7/83

210	215	220	
Leu Phe Phe Val Lys Asn Leu Glu Tyr Gln Glu His Val Thr Glu Tyr			
225	230	235	240
Gly Val His Trp Asn Phe Phe Ile Thr Leu Ser Leu Leu Pro Leu Val			
	245	250	255
Leu Thr Phe Ile Asp Pro Val Thr Arg Met Val Pro Arg Cys Ser Ile			
	260	265	270
Ala Ile Phe Ile Ser Cys Ile Tyr Glu Trp Leu Leu Leu Lys Asp Asp			
	275	280	285
Arg Thr Leu Asn Phe Leu Ile Leu Ala Asp Arg Asn Cys Phe Phe Ser			
	290	295	300
Ala Asn Arg Glu Gly Ile Phe Ser Phe Leu Gly Tyr Cys Ser Ile Phe			
305	310	315	320
Leu Trp Gly Gln Asn Thr Gly Phe Tyr Leu Leu Gly Asn Lys Pro Thr			
	325	330	335
Leu Asn Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Gln Asp Val Val Ala Ala Ser			
	340	345	350
Lys Lys Ser Ser Thr Trp Asp Tyr Trp Thr Ser Val Thr Pro Leu Ser			
	355	360	365
Gly Leu Cys Ile Trp Ser Thr Ile Phe Leu Val Ile Ser Gln Leu Val			
	370	375	380
Phe Gln Tyr His Pro Tyr Ser Val Ser Arg Arg Phe Ala Asn Leu Pro			
385	390	395	400
Tyr Thr Leu Trp Val Ile Thr Tyr Asn Leu Leu Phe Leu Thr Gly Tyr			
	405	410	415
Cys Leu Thr Asp Lys Ile Phe Gly Asn Ser Ser Glu Tyr Tyr Lys Val			

8/83

420	425	430	
Ala Glu Cys Leu Glu Ser Ile Asn Ser Asn Gly Leu Phe Leu Phe Leu			
435	440	445	
Leu Ala Asn Val Ser Thr Gly Leu Val Asn Met Ser Met Val Thr Ile			
450	455	460	
Asp Ser Ser Pro Leu Lys Ser Phe Leu Val Leu Leu Ala Tyr Cys Ser			
465	470	475	480
Phe Ile Ala Val Ile Ser Val Phe Leu Tyr Arg Lys Arg Ile Phe Ile			
485	490	495	
Lys Leu			

<210> 3

<211> 1458

<212> DNA

<213> Candida albicans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1455)

<400> 3

atg tca tcg tct tta aaa caa ttg aaa gaa caa ttt gtc tca gat ttg 48

Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu

1

5

10

15

act ggt ggc aca att gaa gaa att tat gct gta acc agt ata gca tta 96

9/83

Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu	
20 25 30	
tca tct tat ttg tcc ttt aga ttg ttg aaa aag tct ctt ggt gat tta	144
Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu	
35 40 45	
gct ttg att tac gac tac att ctt aat gtg ttg aca att cta gca tcc	192
Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser	
50 55 60	
att act gtt tat agc aac agc cct tct tat ttg cat tat ttt att gtt	240
Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val	
65 70 75 80	
att cca tca tta gtt ata tat cta gtg aat tac cat gtt gag aaa cca	288
Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro	
85 90 95	
tct tca ccc cat aga caa aat gat aca aaa gaa gat aaa tcg gac gaa	336
Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu	
100 105 110	
cta ttg ccg aga aaa caa ttt ata aca gcc tat cgt tct caa atg ttg	384
Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu	
115 120 125	
ata att act aat cta gct ata tta gct gtt gat ttt cct att ttc cca	432
Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro	
130 135 140	
aga aga ttt gcc aaa gtg gaa aca tgg ggc acg tca atg atg gat tta	480
Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu	
145 150 155 160	

10/83

gga gtt ggg tcg ttt gtg ttc tcc atg ggg ttg gct aat tct cga caa	528
Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln	
165 170 175	
ttg atc aag aac cac acc gac aac tac aaa ttt agt tgg aag agt tat	576
Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr	
180 185 190	
ttg aaa aca atc aag cag aac ttt atc aag tca gtg cct ata ctt gtt	624
Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val	
195 200 205	
tta gga gct att cgt ttt gtt agt gtt aag caa ttg gac tat cag gaa	672
Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu	
210 215 220	
cac gaa aca gag tat gga atc cat tgg aat ttt ttc ttc aca tta ggg	720
His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly	
225 230 235 240	
ttc ttg cca att gta ttg gga ata tta gac ccg gtg ttg aat ttg gtt	768
Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val	
245 250 255	
cca cgc ttc ata ata gga att ggt atc tca att gct tat gag gta gcg	816
Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Ala Tyr Glu Val Ala	
260 265 270	
ttg aat aag act ggt ttg ttg aag ttc att ttg agc agc gaa aac aga	864
Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg	
275 280 285	
ctt gaa tct ctc atc acc atg aat aaa gaa ggt att ttt tcg ttt att	912
Leu Glu Ser Leu Ile Thr Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile	

11/83

290	295	300	
gga tat ctt tgt att ttt ata att ggt cag tct ttt ggg tca ttt gtt			960
Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val			
305	310	315	320
tta aca ggc tac aaa aca aag aac aac tta ata acc att agc aaa att			1008
Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile			
	325	330	335
cgt att tca aaa aaa caa cac aag aaa gag ctg ctg ctg ttt ttc tca			1056
Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser			
	340	345	350
gtc gcc act act cag gga tta tat ttg gca tgt atc ttc tat cac tta			1104
Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu			
	355	360	365
gct ttc agt ttg ttc atc agc aac tta tca ttc ttg caa cca att tca			1152
Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser			
	370	375	380
aga cga ttg gcc aat ttc ccc tac gtc atg tgg gtc gtt tcg tac aat			1200
Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn			
	385	390	395
gct acg ttt tta tta tgt tat gac tta att gaa aaa ttt atc ccg ggg			1248
Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly			
	405	410	415
aac ctt act tct act gta ttg gac tct att aat aac aat ggt tta ttt			1296
Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe			
	420	425	430
atc ttc ttg gtc agc aat tta tta aca ggg ttt att aac atg tcc atc			1344

12/83

Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile
 435 440 445
 aac act ttg gaa act agc aat aaa atg gca gtg att atc ttg att ggc 1392
 Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly
 450 455 460
 tat agt ctt act tgg aca ttg ctc gcc tta tat ttg gat aag agg aag 1440
 Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys
 465 470 475 480
 atc tac atc aag ctt tag 1458
 Ile Tyr Ile Lys Leu
 485

<210> 4

<211> 485

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 4

Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu
 1 5 10 15
 Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu
 20 25 30
 Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu
 35 40 45
 Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser

13/83

50	55	60	
Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val			
65	70	75	80
Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro			
	85	90	95
Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu			
	100	105	110
Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu			
	115	120	125
Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro			
	130	135	140
Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu			
145	150	155	160
Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln			
	165	170	175
Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr			
	180	185	190
Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val			
	195	200	205
Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu			
	210	215	220
His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly			
225	230	235	240
Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val			
	245	250	255
Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Ala Tyr Glu Val Ala			

14/83

260	265	270
Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg		
275	280	285
Leu Glu Ser Leu Ile Thr Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile		
290	295	300
Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val		
305	310	315
Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile		
325	330	335
Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser		
340	345	350
Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu		
355	360	365
Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser		
370	375	380
Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn		
385	390	395
Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly		
405	410	415
Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe		
420	425	430
Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile		
435	440	445
Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly		
450	455	460
Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys		

15/83

465 470 475 480

Ile Tyr Ile Lys Leu

485

<210> 5

<211> 1458

<212> DNA

<213> Candida albicans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1455)

<400> 5

atg tca tcg tct tta aaa caa ttg aaa gaa caa ttt gtc tca gat ttg 48

Met Ser Ser Ser Leu Lys Gln Leu Lys Glu Gln Phe Val Ser Asp Leu

1 5 10 15

act ggt ggc aca att gaa gaa att tat gct gta acc agt ata gca tta 96

Thr Gly Gly Thr Ile Glu Glu Ile Tyr Ala Val Thr Ser Ile Ala Leu

20 25 30

tca tct tat ttg tcc ttt aga ttg ttg aaa aag tct ctt ggt gat tta 144

Ser Ser Tyr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Lys Lys Ser Leu Gly Asp Leu

35 40 45

gct ttg att tac gac tac att ctt aat gtg ttg aca att cta gca tcc 192

Ala Leu Ile Tyr Asp Tyr Ile Leu Asn Val Leu Thr Ile Leu Ala Ser

16/83

50	55	60	
att act gtt tat agc aac agc cct tct tat ttg cat tat ttt att gtt			240
Ile Thr Val Tyr Ser Asn Ser Pro Ser Tyr Leu His Tyr Phe Ile Val			
65	70	75	80
att cca tca tta gtt ata tat cta gtg aat tac cat gtt gag aaa cca			288
Ile Pro Ser Leu Val Ile Tyr Leu Val Asn Tyr His Val Glu Lys Pro			
	85	90	95
tct tca ccc cat aga caa aat gat aca aaa gaa gat aaa tcg gac gaa			336
Ser Ser Pro His Arg Gln Asn Asp Thr Lys Glu Asp Lys Ser Asp Glu			
	100	105	110
cta ttg ccg aga aaa caa ttt ata aca gcc tat cgt tct caa atg ttg			384
Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu			
	115	120	125
ata att act aat cta gct ata tta gct gtt gat ttt cct att ttc cca			432
Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro			
	130	135	140
aga aga ttt gcc aaa gtg gaa aca tgg ggc acg tca atg atg gat tta			480
Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu			
145	150	155	160
gga gtt ggg tcg ttt gtg ttc tcc atg ggg ttg gct aat tct cga caa			528
Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln			
	165	170	175
ttg atc aag aac cac acc gac aat tac aaa ttt agt tgg aag agt tat			576
Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr			
	180	185	190
ttg aaa aca atc aag cag aac ttt atc aag tca gtg cct ata ctt gtt			624

17/83

Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val	
195	200
205	
tta gga gct att cgt ttt gtt agt gtt aag caa ttg gac tat cag gaa	672
Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu	
210	215
220	
cac gaa aca gag tat gga atc cat tgg aat ttt ttc ttc aca tta ggg	720
His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly	
225	230
235	240
ttc ttg cca att gta ttg gga ata tta gac ccg gtg ttg aat ttg gtt	768
Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val	
245	250
255	
cca cgc ttc ata ata gga att ggt atc tca att ggt tat gag gta gcg	816
Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Gly Tyr Glu Val Ala	
260	265
270	
ttg aat aag act ggt ttg ttg aag ttc att ttg agc agc gaa aac aga	864
Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg	
275	280
285	
ctt gaa tct ctc atc gcc atg aat aaa gaa ggt att ttt tcg ttt att	912
Leu Glu Ser Leu Ile Ala Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile	
290	295
300	
gga tat ctt tgt att ttt ata att ggt cag tct ttt ggg tca ttt gtt	960
Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val	
305	310
315	320
tta aca ggc tac aaa aca aag aac aac tta ata acc att agc aaa att	1008
Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile	
325	330
335	

18/83

cgt att tca aaa aaa caa cac aag aaa gag ctg ctg ctg ttt ttc tca	1056
Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser	
340 345 350	
gtc gcc act act cag gga tta tat ttg gca tgt atc ttc tat cac tta	1104
Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu	
355 360 365	
gct ttc agt ttg ttc atc agc aac tta tca ttc ttg caa cca att tca	1152
Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser	
370 375 380	
aga cga ttg gcc aat ttc ccc tac gtc atg tgg gtc gtt tgc tac aat	1200
Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn	
385 390 395 400	
gct acg ttt tta tta tgt tat gac tta att gaa aaa ttt atc ccg ggg	1248
Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly	
405 410 415	
aac ctt act tct act gta ttg gac tct att aat aac aat ggt tta ttt	1296
Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe	
420 425 430	
atc ttc ttg gtc agc aat tta tta aca ggg ttt att aac atg tcc atc	1344
Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile	
435 440 445	
aac act ttg gaa act agc aat aaa atg gca gtg att atc ttg att ggc	1392
Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly	
450 455 460	
tat agt ctt act tgg aca ttg ctc gcc tta tat ttg gat aag agg aag	1440
Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys	

19/83

465	470	475	480	
atc tac atc aag ctt tag				1458
Ile Tyr Ile Lys Leu				
485				

<210> 6

<211> 485

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 6

Met	Ser	Ser	Ser	Leu	Lys	Gln	Leu	Lys	Glu	Gln	Phe	Val	Ser	Asp	Leu
1				5					10					15	
Thr	Gly	Gly	Thr	Ile	Glu	Glu	Ile	Tyr	Ala	Val	Thr	Ser	Ile	Ala	Leu
			20					25					30		
Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Phe	Arg	Leu	Leu	Lys	Lys	Ser	Leu	Gly	Asp	Leu
		35					40					45			
Ala	Leu	Ile	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Leu	Asn	Val	Leu	Thr	Ile	Leu	Ala	Ser
	50					55					60				
Ile	Thr	Val	Tyr	Ser	Asn	Ser	Pro	Ser	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ile	Val
65					70					75				80	
Ile	Pro	Ser	Leu	Val	Ile	Tyr	Leu	Val	Asn	Tyr	His	Val	Glu	Lys	Pro
				85					90					95	
Ser	Ser	Pro	His	Arg	Gln	Asn	Asp	Thr	Lys	Glu	Asp	Lys	Ser	Asp	Glu
			100						105					110	

20/83

Leu Leu Pro Arg Lys Gln Phe Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gln Met Leu
 115 120 125
 Ile Ile Thr Asn Leu Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Pro Ile Phe Pro
 130 135 140
 Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Met Met Asp Leu
 145 150 155 160
 Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Met Gly Leu Ala Asn Ser Arg Gln
 165 170 175
 Leu Ile Lys Asn His Thr Asp Asn Tyr Lys Phe Ser Trp Lys Ser Tyr
 180 185 190
 Leu Lys Thr Ile Lys Gln Asn Phe Ile Lys Ser Val Pro Ile Leu Val
 195 200 205
 Leu Gly Ala Ile Arg Phe Val Ser Val Lys Gln Leu Asp Tyr Gln Glu
 210 215 220
 His Glu Thr Glu Tyr Gly Ile His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly
 225 230 235 240
 Phe Leu Pro Ile Val Leu Gly Ile Leu Asp Pro Val Leu Asn Leu Val
 245 250 255
 Pro Arg Phe Ile Ile Gly Ile Gly Ile Ser Ile Gly Tyr Glu Val Ala
 260 265 270
 Leu Asn Lys Thr Gly Leu Leu Lys Phe Ile Leu Ser Ser Glu Asn Arg
 275 280 285
 Leu Glu Ser Leu Ile Ala Met Asn Lys Glu Gly Ile Phe Ser Phe Ile
 290 295 300
 Gly Tyr Leu Cys Ile Phe Ile Ile Gly Gln Ser Phe Gly Ser Phe Val
 305 310 315 320

21/83

Leu Thr Gly Tyr Lys Thr Lys Asn Asn Leu Ile Thr Ile Ser Lys Ile

325

330

335

Arg Ile Ser Lys Lys Gln His Lys Lys Glu Leu Leu Leu Phe Phe Ser

340

345

350

Val Ala Thr Thr Gln Gly Leu Tyr Leu Ala Cys Ile Phe Tyr His Leu

355

360

365

Ala Phe Ser Leu Phe Ile Ser Asn Leu Ser Phe Leu Gln Pro Ile Ser

370

375

380

Arg Arg Leu Ala Asn Phe Pro Tyr Val Met Trp Val Val Ser Tyr Asn

385

390

395

400

Ala Thr Phe Leu Leu Cys Tyr Asp Leu Ile Glu Lys Phe Ile Pro Gly

405

410

415

Asn Leu Thr Ser Thr Val Leu Asp Ser Ile Asn Asn Asn Gly Leu Phe

420

425

430

Ile Phe Leu Val Ser Asn Leu Leu Thr Gly Phe Ile Asn Met Ser Ile

435

440

445

Asn Thr Leu Glu Thr Ser Asn Lys Met Ala Val Ile Ile Leu Ile Gly

450

455

460

Tyr Ser Leu Thr Trp Thr Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Asp Lys Arg Lys

465

470

475

480

Ile Tyr Ile Lys Leu

485

<210> 7

<211> 1458

22/83

<212> DNA

<213> *Candida albicans*

<400> 7

atgtcatcgt ctttaaaaca attgaaagaa caatttgtct cagatttgac tgggtggcaca 60
attgaagaaa tttatgctgt aaccagtata gcattatcat cttatttgte ctttagattg 120
ttgaaaaagt ctcttggtga tttagctttg atttacgact acattcttaa tgtgttgaca 180
attctagcat ccattactgt ttatagcaac agcccttctt atttgcatta ttttattgtt 240
attccatcat tagttatata tctagtgaat taccatgttg agaaaccatc ttcaccccat 300
agacaaaatg atacaaaaga agataaatcg gacgaactat tgccgagaaa acaatttata 360
acagcctatc gttctcaa atgttgataatt actaatctag ctatattage tgttgatttt 420
cctattttcc caagaagatt tgccaaagtg gaaacatggg gcacgtcaat gatggattta 480
ggggttgggt cgtttgtgtt ctccatgggg ttggctaatt ctgcacaatt gatcaagaac 540
cacaccgaca actacaaatt tagttggaag agttatttga aaacaatcaa gcagaacttt 600
atcaagtcag tgcctatact tgttttagga gctattcggt ttgttagtgt taagcaattg 660
gactatcagg aacacgaaac agagtatgga atccattgga attttttctt cacattaggg 720
ttcttgccaa ttgtattggg aatattagac ccggtgttga atttggttcc acgcttcata 780
ataggaattg gtatctcaat tggttatgag gtagcggtga ataagactgg tttgttgaag 840
ttcattttga gcagcgaaaa cagacttgaa tctctcatcg ccatgaataa agaaggtatt 900
ttttcgttta ttggatatct ttgtattttt ataattggte agtcttttgg gtcatttggt 960
ttaacaggct acaaaacaaa gaacaactta ataaccatta gcaaaattcg tatttcaaaa 1020
aaacaacaca agaaagagct gctgctgttt ttctcagtcg ccactactca gggattatat 1080
ttggcatgta tcttctatca cttagctttc agtttgttca tcagcaactt atcattcttg 1140
caaccaattt caagacgatt ggccaatttc ccctacgtca tgtgggtcgt ttcgtacaat 1200
gctacgtttt tattatgtta tgacttaatt gaaaaattta tcccggggaa ccttacttct 1260
actgtattgg attctattaa taacaatggt ttatttatct tcttggtcag caatttatta 1320

23/83

acagggttta ttaacatgtc catcaacact ttggaaacta gcaataaaat ggcagtgatt 1380
atcttgattg gctatagtct tacttggaca ttgctcgcct tatatttgga taagaggaag 1440
atctacatca agctttag 1458

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 8

gcagtcgact cgatgaggtc tttgctaadc ttg 33

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

24/83

<400> 9

gcagaattcg acaccacaac cttgaacgta ttg

33

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

cccgaattca ctgacggtca aatccaagct act

33

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

25/83

<400> 11

ggaagctttt ataacaacat agcggcagca gc

32

<210> 12

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 12

cccgcgccg cttgatagta agcttgcttg ggccgcatca tgtaattag

49

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

26/83

<400> 13

cccggtacca aattaaagcc ttcgagcctc cca

33

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

cccggtacct gtttcagca tgagacttgc ata

33

<210> 15

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

27/83

<400> 15

cccgcggcgcg ccccttccaa ttcgaaaacc ttccccagag cagcc

45

<210> 16

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

ggttcgaagc cgcaaaaaca gaacaacaaa tt

32

<210> 17

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

28/83

<400> 17

ggcttagatt gcagtttttc aagaatgcgc ca

32

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 18

gggtctagaa ctgacgggtca aatccaagct act

33

<210> 19

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

29/83

<400> 19

ggaagctttt ataacaacat agcggcagca gc

32

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Candida albicans

<400> 20

Cys Phe Thr Ala Gly Thr Asn Thr Val The Phe Asn Asp Gly Asp Lys

1

5

10

15

Asp Ile

18

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 21

aaactgttca ctgaacaacc aaatctc

27

30/83

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 22

caactgtacc atttgtaga catcact

27

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 23

aaacagctgg gatcgcaata agaagacacg

30

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Candida albicans

<400> 24

aaacagctga tggaaatgtg gatggtgtg

29

31/83

<210> 25

<211> 60

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 25

atggcaacag tacatcagga gaatatgtcg actttaaaac cggatccccg tcgtttaaac 60

<210> 26

<211> 60

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 26

ttatagctta atgaatattc tttttctata caagaaaacc gaattcgagc tcgtttaaac 60

<210> 27

<211> 1380

<212> DNA

<213> *Schizosaccharomyces pombe*

<220>

<221> CDS

32/83

<222> (1)..(1380)

<400> 27

atg tca tac aaa ttg gaa aaa gaa gca ttt gtc tca aac ctg acg ggt	48
Met Ser Tyr Lys Leu Glu Lys Glu Ala Phe Val Ser Asn Leu Thr Gly	
1 5 10 15	
tca agt tcc att gag aca tgt ggc ttg tta tta ata gga att gct tgc	96
Ser Ser Ser Ile Glu Thr Cys Gly Leu Leu Leu Ile Gly Ile Ala Cys	
20 25 30	
aac gtt ttg tgg gta aac atg act gcg aga aac atc tta ccc aaa ggg	144
Asn Val Leu Trp Val Asn Met Thr Ala Arg Asn Ile Leu Pro Lys Gly	
35 40 45	
aat ctt ggg ttt ctt gtt gag ttt ttc atc ttt tgc tta att cca tta	192
Asn Leu Gly Phe Leu Val Glu Phe Phe Ile Phe Cys Leu Ile Pro Leu	
50 55 60	
ttt gtc att tac gtt tca tgc aaa gtt ggc gtt ttc act ctt tgc ata	240
Phe Val Ile Tyr Val Ser Ser Lys Val Gly Val Phe Thr Leu Cys Ile	
65 70 75 80	
gcc tct ttt ttg cct tcc ttc gtc ctt cat gtt ata agt cca att aat	288
Ala Ser Phe Leu Pro Ser Phe Val Leu His Val Ile Ser Pro Ile Asn	
85 90 95	
tgg gat gtg ctg aga aga aaa cct ggt tgt tgt ctt act aaa aaa aat	336
Trp Asp Val Leu Arg Arg Lys Pro Gly Cys Cys Leu Thr Lys Lys Asn	
100 105 110	
gaa aat act ttt gat cga cga att gct gga gtc aca ttt tat cgt tct	384
Glu Asn Thr Phe Asp Arg Arg Ile Ala Gly Val Thr Phe Tyr Arg Ser	

33/83

115	120	125	
caa atg atg ttg gtt act gtc act tgc atc ctg gcc gtt gac ttt acc			432
Gln Met Met Leu Val Thr Val Thr Cys Ile Leu Ala Val Asp Phe Thr			
130	135	140	
ctt ttc ccg agg aga tat gcc aaa gtt gaa acc tgg gga aca tca ctg			480
Leu Phe Pro Arg Arg Tyr Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu			
145	150	155	160
atg gat ctt ggt gtt gga tct ttc atg ttt tct tca ggt act gtg gct			528
Met Asp Leu Gly Val Gly Ser Phe Met Phe Ser Ser Gly Thr Val Ala			
	165	170	175
gga cgg aaa aat gac att aaa aaa cca aat gcg ttt aaa aat gta ttg			576
Gly Arg Lys Asn Asp Ile Lys Lys Pro Asn Ala Phe Lys Asn Val Leu			
	180	185	190
tgg aat tct ttc atc ctt ttg att tta gga ttt gcg cgc atg ttt tta			624
Trp Asn Ser Phe Ile Leu Leu Ile Leu Gly Phe Ala Arg Met Phe Leu			
	195	200	205
acg aaa agc atc aat tac caa gaa cat gta agc gaa tat ggc atg cat			672
Thr Lys Ser Ile Asn Tyr Gln Glu His Val Ser Glu Tyr Gly Met His			
	210	215	220
tgg aac ttt ttt ttc acc cta ggt ttc atg gct ctt ggc gta ttt ttt			720
Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Phe Met Ala Leu Gly Val Phe Phe			
225	230	235	240
ttt cgt cgt tct tta aaa aaa gtc tcc tat ttt aat tta gca acc ttc			768
Phe Arg Arg Ser Leu Lys Lys Val Ser Tyr Phe Asn Leu Ala Thr Phe			
	245	250	255
att act ctt ctt cat cat tgt ttg ctt gtt tta acc cct ttc caa aaa			816

34/83

Ile Thr Leu Leu His His Cys Leu Leu Val Leu Thr Pro Phe Gln Lys
 260 265 270
 tgg gca cta tcc gcc ccc aga aca aat att ttg gct cag aat aga gag 864
 Trp Ala Leu Ser Ala Pro Arg Thr Asn Ile Leu Ala Gln Asn Arg Glu
 275 280 285
 ggt att gct tct ctt ccc gga tac att gct att tac ttt tat gga atg 912
 Gly Ile Ala Ser Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Ile Tyr Phe Tyr Gly Met
 290 295 300
 tat acc ggt agt gta gtt ttg gct gat cga cct cta atg tat act aga 960
 Tyr Thr Gly Ser Val Val Leu Ala Asp Arg Pro Leu Met Tyr Thr Arg
 305 310 315 320
 gct gag tcg tgg aag cgc ttt caa cgt cta tta ttc ccg cta tgc att 1008
 Ala Glu Ser Trp Lys Arg Phe Gln Arg Leu Leu Phe Pro Leu Cys Ile
 325 330 335
 ttg tta gtg ttg tat ctt gtg tct aac ttt ttg tca gtt ggt gtt tct 1056
 Leu Leu Val Leu Tyr Leu Val Ser Asn Phe Leu Ser Val Gly Val Ser
 340 345 350
 cgc cga ctt gct aat acg cct tat gtt gcg aat gtt gcc ttt atc aat 1104
 Arg Arg Leu Ala Asn Thr Pro Tyr Val Ala Asn Val Ala Phe Ile Asn
 355 360 365
 atg ttt ttt ctt act ata tac ata ctt att gat gcc tat tta ttc cca 1152
 Met Phe Phe Leu Thr Ile Tyr Ile Leu Ile Asp Ala Tyr Leu Phe Pro
 370 375 380
 tct tct gtg cca tat gga agt cgc gtc ccc aaa ctg ctt gaa gat gcc 1200
 Ser Ser Val Pro Tyr Gly Ser Arg Val Pro Lys Leu Leu Glu Asp Ala
 385 390 395 400

35/83

aat aat aat ggc ttg ttg gtg ttt ttg att gct aac gtt tta aca gga 1248

Asn Asn Asn Gly Leu Leu Val Phe Leu Ile Ala Asn Val Leu Thr Gly

405

410

415

gta gtt aat tta tcg ttc gac acc ctt cat tct agc aat gca aaa ggc 1296

Val Val Asn Leu Ser Phe Asp Thr Leu His Ser Ser Asn Ala Lys Gly

420

425

430

ttg aca atc atg act atg tat ctt ttt att att tgc tat atg gca cat 1344

Leu Thr Ile Met Thr Met Tyr Leu Phe Ile Ile Cys Tyr Met Ala His

435

440

445

tgg ctt gct caa cac gga att cgt ttt cgc ctt tag 1380

Trp Leu Ala Gln His Gly Ile Arg Phe Arg Leu

450

455

460

<210> 28

<211> 459

<212> PRT

<213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 28

Met Ser Tyr Lys Leu Glu Lys Glu Ala Phe Val Ser Asn Leu Thr Gly

1

5

10

15

Ser Ser Ser Ile Glu Thr Cys Gly Leu Leu Leu Ile Gly Ile Ala Cys

20

25

30

Asn Val Leu Trp Val Asn Met Thr Ala Arg Asn Ile Leu Pro Lys Gly

35

40

45

36/83

Asn Leu Gly Phe Leu Val Glu Phe Phe Ile Phe Cys Leu Ile Pro Leu

50

55

60

Phe Val Ile Tyr Val Ser Ser Lys Val Gly Val Phe Thr Leu Cys Ile

65

70

75

80

Ala Ser Phe Leu Pro Ser Phe Val Leu His Val Ile Ser Pro Ile Asn

85

90

95

Trp Asp Val Leu Arg Arg Lys Pro Gly Cys Cys Leu Thr Lys Lys Asn

100

105

110

Glu Asn Thr Phe Asp Arg Arg Ile Ala Gly Val Thr Phe Tyr Arg Ser

115

120

125

Gln Met Met Leu Val Thr Val Thr Cys Ile Leu Ala Val Asp Phe Thr

130

135

140

Leu Phe Pro Arg Arg Tyr Ala Lys Val Glu Thr Trp Gly Thr Ser Leu

145

150

155

160

Met Asp Leu Gly Val Gly Ser Phe Met Phe Ser Ser Gly Thr Val Ala

165

170

175

Gly Arg Lys Asn Asp Ile Lys Lys Pro Asn Ala Phe Lys Asn Val Leu

180

185

190

Trp Asn Ser Phe Ile Leu Leu Ile Leu Gly Phe Ala Arg Met Phe Leu

195

200

205

Thr Lys Ser Ile Asn Tyr Gln Glu His Val Ser Glu Tyr Gly Met His

210

215

220

Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Phe Met Ala Leu Gly Val Phe Phe

225

230

235

240

Phe Arg Arg Ser Leu Lys Lys Val Ser Tyr Phe Asn Leu Ala Thr Phe

245

250

255

37/83

Ile Thr Leu Leu His His Cys Leu Leu Val Leu Thr Pro Phe Gln Lys

260

265

270

Trp Ala Leu Ser Ala Pro Arg Thr Asn Ile Leu Ala Gln Asn Arg Glu

275

280

285

Gly Ile Ala Ser Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Ile Tyr Phe Tyr Gly Met

290

295

300

Tyr Thr Gly Ser Val Val Leu Ala Asp Arg Pro Leu Met Tyr Thr Arg

305

310

315

320

Ala Glu Ser Trp Lys Arg Phe Gln Arg Leu Leu Phe Pro Leu Cys Ile

325

330

335

Leu Leu Val Leu Tyr Leu Val Ser Asn Phe Leu Ser Val Gly Val Ser

340

345

350

Arg Arg Leu Ala Asn Thr Pro Tyr Val Ala Asn Val Ala Phe Ile Asn

355

360

365

Met Phe Phe Leu Thr Ile Tyr Ile Leu Ile Asp Ala Tyr Leu Phe Pro

370

375

380

Ser Ser Val Pro Tyr Gly Ser Arg Val Pro Lys Leu Leu Glu Asp Ala

385

390

395

400

Asn Asn Asn Gly Leu Leu Val Phe Leu Ile Ala Asn Val Leu Thr Gly

405

410

415

Val Val Asn Leu Ser Phe Asp Thr Leu His Ser Ser Asn Ala Lys Gly

420

425

430

Leu Thr Ile Met Thr Met Tyr Leu Phe Ile Ile Cys Tyr Met Ala His

435

440

445

Trp Leu Ala Gln His Gly Ile Arg Phe Arg Leu

450

455

38/83

<210> 29

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)

<223> n represents a, g, c or t.

39/83

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)

<223> n represents a, g, c or t.

<400> 29

gcnaargtng aracntgggg nacnwsnytn atgga

35

<210> 30

<211> 38

40/83

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)

<223> n represents a, g, c or t.

41/83

<400> 30

ttccartgna yncertaytc ngtnacrtgy tcytgrta

38

<210> 31

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)

<223> n represents a, g, c or t.

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)

<223> n represents a, g, c or t.

<400> 31

gtraaraara arttccartg nayncertay tc

32

42/83

<210> 32

<211> 188

<212> DNA

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 32

```

atggatctgg gcgttgatc gtttgtcttt tcgggcggag tagtatccgc tcgctcacta   60
ctcaagagca ggaccaatgg ctctaaaagg ttgcctcttg ccaagaggtt gattgcgtcg  120
acgcgacact ctattcctct gtcgtcctc ggctgattc ggctatacag cgtcaaagge  180
ttggacta                                     188

```

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 33

ggagtagtat ccgctcgctc acta

24

43/83

<210> 34

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 34

gtccaagcct ttgacgctgt atagc

25

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 35

gggatgtgct gcaaggcgat taagt

25

<210> 36

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 36

tttatgcttc cggctcgtat gttgtg

26

44/83

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 37

aaaggtgcaa atccccgcggc attga

25

<210> 38

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 38

agttcactat atatcttcaa cacaccac

28

<210> 39

<211> 1576

<212> DNA

<213> *Aspergillus fumigatus*

<220>

<221> CDS

45/83

<222> (31)..(1536)

<400> 39

```

aaggtgcaaa tcccgcggca ttgagtcaag atg gat cca gat tat aaa gct cgc      54
                                Met Asp Pro Asp Tyr Lys Ala Arg
                                1              5

aaa gag gcc ttt gtc tca ggt ctt gca gga gga agc atc ctg gaa atc      102
Lys Glu Ala Phe Val Ser Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ile Leu Glu Ile
    10              15              20

aac gcc gtc acc ttg gtt gct tcg gta tcc gtt ttt ctg tgg tca att      150
Asn Ala Val Thr Leu Val Ala Ser Val Ser Val Phe Leu Trp Ser Ile
    25              30              35              40

cta caa tct cgc cta tcc ttt ttc aca ccc tac agc gcc gct gcc ctt      198
Leu Gln Ser Arg Leu Ser Phe Phe Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Ala Leu
                45              50              55

ctc gtt gat ttc ctg ctc aat gta cta gct atc ttg ttc gca acc act      246
Leu Val Asp Phe Leu Leu Asn Val Leu Ala Ile Leu Phe Ala Thr Thr
                60              65              70

tta tac tct tcg gcg cct ctt ctt ctc aat ctc ctt cta ata tct ccc      294
Leu Tyr Ser Ser Ala Pro Leu Leu Leu Asn Leu Leu Leu Ile Ser Pro
                75              80              85

gct ctg ctg ata ctc ctc tct acg aaa cgt cct cgg acc ccc gtc aaa      342
Ala Leu Leu Ile Leu Leu Ser Thr Lys Arg Pro Arg Thr Pro Val Lys
    90              95              100

gcg aaa cct cct cgc cag tcc gct aga gct ggg aaa gat gac tcg aaa      390
Ala Lys Pro Pro Arg Gln Ser Ala Arg Ala Gly Lys Asp Asp Ser Lys

```


46/83

105	110	115	120	
cat gcg aca gcc ttg cca gag tct cta ccc att cat cca ttt ctc acg				438
His Ala Thr Ala Leu Pro Glu Ser Leu Pro Ile His Pro Phe Leu Thr				
	125	130	135	
aca tat cgc gcc gcc atg atg gtt atc acg tgc atc gct atc ttg gct				486
Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Val Ile Thr Cys Ile Ala Ile Leu Ala				
	140	145	150	
gtg gat ttt cgc att ttt cct cgc cga ttc gcc aag gta gaa aac tgg				534
Val Asp Phe Arg Ile Phe Pro Arg Arg Phe Ala Lys Val Glu Asn Trp				
	155	160	165	
ggt aca tca ctc atg gat ctg ggc gtt gga tcg ttt gtc ttt tcg ggc				582
Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Gly				
	170	175	180	
gga gta gta tcc gct cgc tca cta ctc aag agc agg acc aat ggc tct				630
Gly Val Val Ser Ala Arg Ser Leu Leu Lys Ser Arg Thr Asn Gly Ser				
185	190	195	200	
aaa agg ttg cct ctt gcc aag agg ttg att gcg tcg acg cga cac tct				678
Lys Arg Leu Pro Leu Ala Lys Arg Leu Ile Ala Ser Thr Arg His Ser				
	205	210	215	
att cct ctg ctc gtc ctc ggc ctg att cgg cta tac agc gtc aaa ggc				726
Ile Pro Leu Leu Val Leu Gly Leu Ile Arg Leu Tyr Ser Val Lys Gly				
	220	225	230	
ttg gac tat gcg gag cac gtc acc gag tac ggc gta cat tgg aac ttc				774
Leu Asp Tyr Ala Glu His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe				
	235	240	245	
ttc ttt aca ttg ggt ctt ttg cct ccg ttc gtg gag gtc ttc gac gcc				822

47/83

Phe Phe Thr Leu Gly Leu Leu Pro Pro Phe Val Glu Val Phe Asp Ala
 250 255 260
 ttg gct acg atc att ccg tca tac gag gtt ctc tcc gtg ggg atc gcc 870
 Leu Ala Thr Ile Ile Pro Ser Tyr Glu Val Leu Ser Val Gly Ile Ala
 265 270 275 280
 gtc ttg tat caa gtt gcc cta gag tca aca gac ttg aaa agc tac atc 918
 Val Leu Tyr Gln Val Ala Leu Glu Ser Thr Asp Leu Lys Ser Tyr Ile
 285 290 295
 ctc gtc tcc cct cgt ggg cca agc tta ctg tcc aag aat cgt gaa ggc 966
 Leu Val Ser Pro Arg Gly Pro Ser Leu Leu Ser Lys Asn Arg Glu Gly
 300 305 310
 gtc ttc tcc ttc tca ggt tat ctc gcg att ttt ctt gct ggt cgt gcg 1014
 Val Phe Ser Phe Ser Gly Tyr Leu Ala Ile Phe Leu Ala Gly Arg Ala
 315 320 325
 atc ggc att cgg ata atc cct cgc gga act tct ttc tca aga agc cca 1062
 Ile Gly Ile Arg Ile Ile Pro Arg Gly Thr Ser Phe Ser Arg Ser Pro
 330 335 340
 gaa cag gcc agg aga cgg gtc ctg atc agc ctt ggc gtg caa gcg tta 1110
 Glu Gln Ala Arg Arg Arg Val Leu Ile Ser Leu Gly Val Gln Ala Leu
 345 350 355 360
 gtg tgg acc act ctt ttt gtg ttg aac tcc act tat gcg atg gga tac 1158
 Val Trp Thr Thr Leu Phe Val Leu Asn Ser Thr Tyr Ala Met Gly Tyr
 365 370 375
 gga gct aat atc cct gtc tcc cgc cgc ctc gct aac atg ccc tat gtc 1206
 Gly Ala Asn Ile Pro Val Ser Arg Arg Leu Ala Asn Met Pro Tyr Val
 380 385 390

48/83

ctt tgg gtt tcg gcg ttc aac acc gcg caa ctg ttt gtg ttc tgc ctg 1254
 Leu Trp Val Ser Ala Phe Asn Thr Ala Gln Leu Phe Val Phe Cys Leu
 395 400 405
 atc gaa aca ctc tgc ttt cct gca gtt cat cgg aca acg act caa gag 1302
 Ile Glu Thr Leu Cys Phe Pro Ala Val His Arg Thr Thr Thr Gln Glu
 410 415 420
 agc gaa tct gag cga gtc gat ttt gct acg agc cga atc atg tcg gcc 1350
 Ser Glu Ser Glu Arg Val Asp Phe Ala Thr Ser Arg Ile Met Ser Ala
 425 430 435 440
 ttc aat aag aac agt ctc gcg atc ttt ctt ttg gcc aat ctt ctg act 1398
 Phe Asn Lys Asn Ser Leu Ala Ile Phe Leu Leu Ala Asn Leu Leu Thr
 445 450 455
 gga gct gtg aat ctg agc atc tcc aca att gat gct aat aca gcg cag 1446
 Gly Ala Val Asn Leu Ser Ile Ser Thr Ile Asp Ala Asn Thr Ala Gln
 460 465 470
 gcc atc gct gtt ctc att gga tat tca tcc att atc aca ggg gtt gct 1494
 Ala Ile Ala Val Leu Ile Gly Tyr Ser Ser Ile Ile Thr Gly Val Ala
 475 480 485
 cta gca ttg cat cat gcc aat atc aaa gta ctt cct ttc tag 1536
 Leu Ala Leu His His Ala Asn Ile Lys Val Leu Pro Phe
 490 495 500
 ggtatttacg agcaattggt ggtgtgttga agatatatag 1576

<210> 40

<211> 501

49/83

<212> PRT

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 40

Met Asp Pro Asp Tyr Lys Ala Arg Lys Glu Ala Phe Val Ser Gly Leu

1 5 10 15

Ala Gly Gly Ser Ile Leu Glu Ile Asn Ala Val Thr Leu Val Ala Ser

20 25 30

Val Ser Val Phe Leu Trp Ser Ile Leu Gln Ser Arg Leu Ser Phe Phe

35 40 45

Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Ala Leu Leu Val Asp Phe Leu Leu Asn Val

50 55 60

Leu Ala Ile Leu Phe Ala Thr Thr Leu Tyr Ser Ser Ala Pro Leu Leu

65 70 75 80

Leu Asn Leu Leu Leu Ile Ser Pro Ala Leu Leu Ile Leu Leu Ser Thr

85 90 95

Lys Arg Pro Arg Thr Pro Val Lys Ala Lys Pro Pro Arg Gln Ser Ala

100 105 110

Arg Ala Gly Lys Asp Asp Ser Lys His Ala Thr Ala Leu Pro Glu Ser

115 120 125

Leu Pro Ile His Pro Phe Leu Thr Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Val

130 135 140

Ile Thr Cys Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Arg Ile Phe Pro Arg

145 150 155 160

Arg Phe Ala Lys Val Glu Asn Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly

165 170 175

50/83

Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Gly Gly Val Val Ser Ala Arg Ser Leu
 180 185 190
 Leu Lys Ser Arg Thr Asn Gly Ser Lys Arg Leu Pro Leu Ala Lys Arg
 195 200 205
 Leu Ile Ala Ser Thr Arg His Ser Ile Pro Leu Leu Val Leu Gly Leu
 210 215 220
 Ile Arg Leu Tyr Ser Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Glu His Val Thr
 225 230 235 240
 Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Leu Leu Pro
 245 250 255
 Pro Phe Val Glu Val Phe Asp Ala Leu Ala Thr Ile Ile Pro Ser Tyr
 260 265 270
 Glu Val Leu Ser Val Gly Ile Ala Val Leu Tyr Gln Val Ala Leu Glu
 275 280 285
 Ser Thr Asp Leu Lys Ser Tyr Ile Leu Val Ser Pro Arg Gly Pro Ser
 290 295 300
 Leu Leu Ser Lys Asn Arg Glu Gly Val Phe Ser Phe Ser Gly Tyr Leu
 305 310 315 320
 Ala Ile Phe Leu Ala Gly Arg Ala Ile Gly Ile Arg Ile Ile Pro Arg
 325 330 335
 Gly Thr Ser Phe Ser Arg Ser Pro Glu Gln Ala Arg Arg Arg Val Leu
 340 345 350
 Ile Ser Leu Gly Val Gln Ala Leu Val Trp Thr Thr Leu Phe Val Leu
 355 360 365
 Asn Ser Thr Tyr Ala Met Gly Tyr Gly Ala Asn Ile Pro Val Ser Arg
 370 375 380

51/83

Arg Leu Ala Asn Met Pro Tyr Val Leu Trp Val Ser Ala Phe Asn Thr
385 390 395 400
Ala Gln Leu Phe Val Phe Cys Leu Ile Glu Thr Leu Cys Phe Pro Ala
405 410 415
Val His Arg Thr Thr Thr Gln Glu Ser Glu Ser Glu Arg Val Asp Phe
420 425 430
Ala Thr Ser Arg Ile Met Ser Ala Phe Asn Lys Asn Ser Leu Ala Ile
435 440 445
Phe Leu Leu Ala Asn Leu Leu Thr Gly Ala Val Asn Leu Ser Ile Ser
450 455 460
Thr Ile Asp Ala Asn Thr Ala Gln Ala Ile Ala Val Leu Ile Gly Tyr
465 470 475 480
Ser Ser Ile Ile Thr Gly Val Ala Leu Ala Leu His His Ala Asn Ile
485 490 495
Lys Val Leu Pro Phe
500

<210> 41

<211> 1648

<212> DNA

<213> *Aspergillus fumigatus*

<220>

<221> intron

<222> (122)..(198)

52/83

<220>

<221> CDS

<222> (26)..(121)

<220>

<221> CDS

<222> (199)..(1608)

<400> 41

gcaaatcccg cggcattgag tcaag atg gat cca gat tat aaa gct cgc aaa 52

Met Asp Pro Asp Tyr Lys Ala Arg Lys

1

5

gag gcc ttt gtc tca ggt ctt gca gga gga agc atc ctg gaa atc aac 100

Glu Ala Phe Val Ser Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ile Leu Glu Ile Asn

10

15

20

25

gcc gtc acc ttg gtt gct tgc gttcgtgtta ctatcttatt gtggctactt 151

Ala Val Thr Leu Val Ala Ser

30

cgctacatt gtttctcgac taaccgagtc tctttgcgat caatcag gta tcc gtt 207

Val Ser Val

35

53/83

ttt ctg tgg tca att cta caa tct cgc cta tcc ttt ttc aca ccc tac 255

Phe Leu Trp Ser Ile Leu Gln Ser Arg Leu Ser Phe Phe Thr Pro Tyr

40

45

50

agc gcc gct gcc ctt ctc gtt gat ttc ctg ctc aat gta cta gct atc 303

Ser Ala Ala Ala Leu Leu Val Asp Phe Leu Leu Asn Val Leu Ala Ile

55

60

65

ttg ttc gca acc act tta tac tct tcg gcg cct ctt ctt ctc aat ctc 351

Leu Phe Ala Thr Thr Leu Tyr Ser Ser Ala Pro Leu Leu Leu Asn Leu

70

75

80

ctt cta ata tct ccc gct ctg ctg ata ctc ctc tct acg aaa cgt cct 399

Leu Leu Ile Ser Pro Ala Leu Leu Ile Leu Leu Ser Thr Lys Arg Pro

85

90

95

cgg acc ccc gtc aaa gcg aaa cct cct cgc cag tcc gct aga gct ggg 447

Arg Thr Pro Val Lys Ala Lys Pro Pro Arg Gln Ser Ala Arg Ala Gly

100

105

110

115

aaa gat gac tcg aaa cat gcg aca gcc ttg cca gag tct cta ccc att 495

Lys Asp Asp Ser Lys His Ala Thr Ala Leu Pro Glu Ser Leu Pro Ile

120

125

130

cat cca ttt ctc acg aca tat cgc gcc gcc atg atg gtt atc acg tgc 543

His Pro Phe Leu Thr Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Val Ile Thr Cys

54/83

135	140	145	
atc gct atc ttg gct gtg gat ttt cgc att ttt cct cgc cga ttc gcc 591			
Ile Ala Ile Leu Ala Val Asp Phe Arg Ile Phe Pro Arg Arg Phe Ala			
150	155	160	
aag gta gaa aac tgg ggt aca tca ctc atg gat ctg ggc gtt gga tcg 639			
Lys Val Glu Asn Trp Gly Thr Ser Leu Met Asp Leu Gly Val Gly Ser			
165	170	175	
ttt gtc ttt tcg ggc gga gta gta tcc gct cgc tca cta ctc aag agc 687			
Phe Val Phe Ser Gly Gly Val Val Ser Ala Arg Ser Leu Leu Lys Ser			
180	185	190	195
agg acc aat ggc tct aaa agg ttg cct ctt gcc aag agg ttg att gcg 735			
Arg Thr Asn Gly Ser Lys Arg Leu Pro Leu Ala Lys Arg Leu Ile Ala			
200	205	210	
tcg acg cga cac tct att cct ctg ctc gtc ctc ggc ctg att cgg cta 783			
Ser Thr Arg His Ser Ile Pro Leu Leu Val Leu Gly Leu Ile Arg Leu			
215	220	225	
tac agc gtc aaa ggc ttg gac tat gcg gag cac gtc acc gag tac gcc 831			
Tyr Ser Val Lys Gly Leu Asp Tyr Ala Glu His Val Thr Glu Tyr Gly			
230	235	240	

55/83

gta cat tgg aac ttc ttc ttt aca ttg ggt ctt ttg cct ccg ttc gtg 879

Val His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Gly Leu Leu Pro Pro Phe Val

245

250

255

gag gtc ttc gac gcc ttg gct acg atc att ccg tca tac gag gtt ctc 927

Glu Val Phe Asp Ala Leu Ala Thr Ile Ile Pro Ser Tyr Glu Val Leu

260

265

270

275

tcc gtg ggg atc gcc gtc ttg tat caa gtt gcc cta gag tca aca gac 975

Ser Val Gly Ile Ala Val Leu Tyr Gln Val Ala Leu Glu Ser Thr Asp

280

285

290

ttg aaa agc tac atc ctc gtc tcc cct cgt ggg cca agc tta ctg tcc 1023

Leu Lys Ser Tyr Ile Leu Val Ser Pro Arg Gly Pro Ser Leu Leu Ser

295

300

305

aag aat cgt gaa ggc gtc ttc tcc ttc tca ggt tat ctc gcg att ttt 1071

Lys Asn Arg Glu Gly Val Phe Ser Phe Ser Gly Tyr Leu Ala Ile Phe

310

315

320

ctt gct ggt cgt gcg atc ggc att cgg ata atc cct cgc gga act tct 1119

Leu Ala Gly Arg Ala Ile Gly Ile Arg Ile Ile Pro Arg Gly Thr Ser

325

330

335

ttc tca aga agc cca gaa cag gcc agg aga cgg gtc ctg atc agc ctt 1167

Phe Ser Arg Ser Pro Glu Gln Ala Arg Arg Arg Val Leu Ile Ser Leu

56/83

340

345

350

355

ggc gtg caa gcg tta gtg tgg acc act ctt ttt gtg ttg aac tcc act 1215

Gly Val Gln Ala Leu Val Trp Thr Thr Leu Phe Val Leu Asn Ser Thr

360

365

370

tat gcg atg gga tac gga gct aat atc cct gtc tcc cgc cgc ctc gct 1263

Tyr Ala Met Gly Tyr Gly Ala Asn Ile Pro Val Ser Arg Arg Leu Ala

375

380

385

aac atg ccc tat gtc ctt tgg gtt tcg gcg ttc aac acc gcg caa ctg 1311

Asn Met Pro Tyr Val Leu Trp Val Ser Ala Phe Asn Thr Ala Gln Leu

390

395

400

ttt gtg ttc tgc ctg atc gaa aca ctc tgc ttt cct gca gtt cat cgg 1359

Phe Val Phe Cys Leu Ile Glu Thr Leu Cys Phe Pro Ala Val His Arg

405

410

415

aca acg act caa gag agc gaa tct gag cga gtc gat ttt gct acg agc 1407

Thr Thr Thr Gln Glu Ser Glu Ser Glu Arg Val Asp Phe Ala Thr Ser

420

425

430

435

cga atc atg tcg gcc ttc aat aag aac agt ctc gcg atc ttt ctt ttg 1455

Arg Ile Met Ser Ala Phe Asn Lys Asn Ser Leu Ala Ile Phe Leu Leu

440

445

450

57/83

gcc aat ctt ctg act gga gct gtg aat ctg agc atc tcc aca att gat 1503

Ala Asn Leu Leu Thr Gly Ala Val Asn Leu Ser Ile Ser Thr Ile Asp

455

460

465

gct aat aca gcg cag gcc atc gct gtt ctc att gga tat tca tcc att 1551

Ala Asn Thr Ala Gln Ala Ile Ala Val Leu Ile Gly Tyr Ser Ser Ile

470

475

480

atc aca ggg gtt gct cta gca ttg cat cat gcc aat atc aaa gta ctt 1599

Ile Thr Gly Val Ala Leu Ala Leu His His Ala Asn Ile Lys Val Leu

485

490

495

cct ttc tag ggtatttacg agcaattggt ggtgtgttga agatatatag 1648

Pro Phe

500

<210> 42

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 42

gccataataa gctaccgaat tgcaatg

27

58/83

<210> 43

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 43

cattaacacc cccattgaca accacg

26

<210> 44

<211> 1869

<212> DNA

<213> Cryptococcus neoformans

<400> 44

ggggattaca agtcggccaa agaggccttt gtctcggata acccaggtgc ttctatctgg 60
agtatcaacg ctgtcagcct ggctgcactg gtatgtagct cgttctccga ggggttctgt 120
catttgaga cgcttattaa ttgggatcgc aggcgacata tgctctctgg atcgccttat 180
cgccgtacat ccgtcatgga ctctgaaca actacctgat ctgtgttctt cccctattat 240
tcggggtgac catcttctca acttcgcctc tcgtatttac ctcttttttg tccattattt 300
ccctcgcttt catcacgaaa tccccaaaat gcttcaaate tgctcagttcg cccgaaaagc 360
caaaaggcca atggctagac gaatcagact ccgatgagga accagcggaa cctgcttctg 420
cagctggate tgcagcagtc tcaccagtaa agcttctacc ttcccaagtg gcgttcgctt 480
cgggatccct attatctccc gatccgacaa cateccccc atgtcgccaagt agttcttcag 540
cttcaggaca tgaagaccct ttggggatta tgggcgttaa cagacggagg tcgctattag 600
aaggagtttc gcttgatgtt ccgtcacata tcgactccaa ggtcagaata tctcctgttc 660

59/83

cctacttgag gctcaaaaag tctagggcaa cgaaggcgca atgggtgaaa gaaaaggga 720
 gattaccatt tttagacagtg taccgagcgc acatgatgct catgactgtt atctgcatct 780
 tggcggtaga ttttgaagtg tttcctagat ggcagggcaa gtgcgaagat tttggtacta 840
 gtctggttaag ctttccttca gccatgggtcc agtgcctacc gctctacttg ccgtagatgg 900
 acgtgggtgt cgggtcattc gtcttttccc tcgggtctgt ctccacaaaa tctctttctc 960
 ctccacctcc aactcctacg cctcctcgc ccgctctcaa ctctcacatc attccctca 1020
 ccccgctccc gttaacttcc atctcatct cgctccgaaa atccatcccc atcctcgtcc 1080
 tcggctttat acggttgatt atggtaagg gatctgatta tcttgagcat gtgacggagt 1140
 acggcgtgca ctggaatttc ttcttcaccc tcgcattggc tctgtgctc gccgtgggca 1200
 ttcgaccatt gacgcagtgg ctctcgtgga gtgtgcttgg ggtaatcacc tctttgctgc 1260
 atcagctgtg gttaacatat tatctccaat ccacgtctt ctcatcggc cggtcaggta 1320
 tctttctagc aaacaaggaa ggcttctcct ctcttctcgtg ttatctttcc atatttttga 1380
 tcggcttgct tattggagat catgttttaa ggctcagttt accaccaaga agagagaggg 1440
 tcgtgtcaga aacaaatgaa gagcatgagc agagtcattt tgagagaaaa aaattggatt 1500
 tgattatgga gttgattgga tatagcttag gctgggtggc actcttagga ggctggattt 1560
 gggccggcgg ggaggtatcc aggcgttttag taagtggaca tctttggtaa tattgtacct 1620
 atactaatcc ctgcataaag gccaacgctc cttatgtatt ttgggtagcg gcatacaata 1680
 ccacctttct cctcggctac ctctcctta cccacattat tccatctccc acctcttccc 1740
 aaacatcacc atcgatctta gtgcctccct tgctcgacgc tatgaataaa aacggtctcg 1800
 cgatattttt ggcggccaac ttgcttacag gactggtgaa tgtgagcatg aagacaatgt 1860
 atgcgccgg 1869

<210> 45

<211> 27

<212> DNA

60/83

<213> Artificial

<400> 45

gtaaaggaag gcgctagaaa agatatg

27

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 46

ctcatcggag tctgattcgt ctagcc

26

<210> 47

<211> 470

<212> DNA

<213> Cryptococcus neoformans

<400> 47

gaaggcgcta gaaaagatat ggtcttgtca tagcattaaa tccccgcat aataagctac 60

tgaattgcaa tgggggatta caagtcggcc aaagaggcct ttgtctcgga taaccaggt 120

gcttctatct ggagtatcaa cgctgtcagc ctggtcgcac tggatgtag ctggttctcc 180

gaggggttct gtcatttga gacgcttatt aattgggatc gcaggcgaca tatgctctct 240

ggatcgccctt atcgccgtac atccgtcatg gactcctgaa caactacctg atctgtgttc 300

61/83

ttcccctatt attcggggtg accatcttct caacttcgcc tctcgtatctt acctcttttt 360
tgtccattat ttccctcgct ttcatacga aatcccaaaa atgcttcaaa tctgtcagtt 420
cgcccga aaa gccaaaaggc caatggctag acgaatcaga ctccgatgag 470

<210> 48

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 48

gcccacgcgt cgactagtag tttttttttt tttttt 37

<210> 49

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 49

catcttggcg gtagattttg aagtgttcc 29

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

62/83

<213> Artificial

<400> 50

ggccacgcgt cgactagtac

20

<210> 51

<211> 1136

<212> DNA

<213> *Cryptococcus neoformans*

<400> 51

gcggtagatt ttgaagtgtt ccctagatgg cagggcaagt gcgaagattt tggtagtagt 60
ctgatggacg tgggtgtcgg gtcattcgtc tttccctcg gtctcgtctc cacaaaatct 120
ctttctctc caccaccaac tctacgccc tctcgcggc ctctcaactc tcacatcatt 180
cccctacccc cgtccccgtt cacttccatc ctcatctcgc tccgaaaatc catccccatc 240
ctcgtcctcg gctttatacg gttgattatg gtcaagggat ctgattatcc tgagcatgtg 300
acggagtacg gcgtgcactg gaatttcttc ttcacctcg cattggttcc tgtgtctgcc 360
gtgggcattc gaccattgac gcagtggctt cgctggagtg tgcttggggg aatcatctct 420
ttgctgcatc agctgtgggt aacatattat ctccaatcca tegtcttctc attcgccggg 480
tcaggtatct ttctagcaaa caaggaagge ttctctctc ttcttggtta tctttccata 540
tttttgatcg gcttgtctat tggagatcat gttttaagge tcagtttacc accaagaaga 600
gagagggtcg tgtcagaaac aaatgaagag catgagcaga gtcattttga gagaaaaaaa 660
ttggatttga ttatggagtt gattggatat agcttaggct ggtgggcact cttaggaggc 720
tggatttggg ccggcgggga ggtatccagg cgtttagcca acgctcctta tgtattttgg 780
gtagcgcat acaataccac ctttctctc ggctacctcc tcttaccaca cattattcca 840

63/83

tctccacct cttcccaaac atcaccatcg atcttagtgc ctcccttgct cgacgctatg 900
aataaaaacg gtctcgcgat atttttggcg gccaaacttg ttacaggact ggtgaatgtg 960
agcatgaaga caatgtatgc gccggcgtgg ttgtcaatgg gggtgtaaat gttgtatacc 1020
ttgacaatca gttgtgtagg gtggatactg aaaggacgga ggatcaagat atagttaaag 1080
tgtttaccat gcaggatact gagtatctcg gttcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1136

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 52

gtcttgatcat agcattaaat ccccgcc 27

<210> 53

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 53

gaaccgagat actcagtatc ctgcatgg 28

<210> 54

64/83

<211> 2045

<212> DNA

<213> *Cryptococcus neoformans*

<220>

<221> intron

<222> (137)..(198)

<220>

<221> intron

<222> (892)..(942)

<220>

<221> intron

<222> (1636)..(1686)

<220>

<221> CDS

<222> (44)..(2001)

<400> 54

gtcatagcat taaatccccg ccataataag ctactgaatt gca atg ggg gat tac 55

Met Gly Asp Tyr

1

aag tcg gcc aaa gag gcc ttt gtc tcg gat aac cca ggt gct tct atc 103

Lys Ser Ala Lys Glu Ala Phe Val Ser Asp Asn Pro Gly Ala Ser Ile

65/83

5	10	15	20	
tgg agt atc aac gct gtc agc ctg gtc gca ctg gtagtagct cgttctccga	156			
Trp Ser Ile Asn Ala Val Ser Leu Val Ala Leu				
25	30			
ggggttctgt catttggaga cgcttattaa ttgggatcgc ag gcg aca tat gct	210			
	Ala Thr Tyr Ala			
	35			
ctc tgg atc gcc tta tcg ccg tac atc cgt cat gga ctc ctg aac aac	258			
Leu Trp Ile Ala Leu Ser Pro Tyr Ile Arg His Gly Leu Leu Asn Asn				
40	45	50		
tac ctg atc tgt gtt ctt ccc cta tta ttc ggg gtg acc atc ttc tca	306			
Tyr Leu Ile Cys Val Leu Pro Leu Leu Phe Gly Val Thr Ile Phe Ser				
55	60	65		
act tcg cct ctc gta ttt acc tct ttt ttg tcc att att tcc ctc gct	354			
Thr Ser Pro Leu Val Phe Thr Ser Phe Leu Ser Ile Ile Ser Leu Ala				
70	75	80		
ttc atc acg aaa tcc caa aaa tgc ttc aaa tct gtc agt tcg ccc gaa	402			
Phe Ile Thr Lys Ser Gln Lys Cys Phe Lys Ser Val Ser Ser Pro Glu				
85	90	95		
aag cca aaa ggc caa tgg cta gac gaa tca gac tcc gat gag gaa cca	450			
Lys Pro Lys Gly Gln Trp Leu Asp Glu Ser Asp Ser Asp Glu Glu Pro				
100	105	110	115	
gcg gaa cct gct tct gca gct gga tct gca gca gtc tca cca gta aag	498			
Ala Glu Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Val Ser Pro Val Lys				
120	125	130		
ctt cta cct tcc caa gtg gcg ttc gct tcg gga tcc cta tta tct ccc	546			

66/83

Leu Leu Pro Ser Gln Val Ala Phe Ala Ser Gly Ser Leu Leu Ser Pro
 135 140 145
 gat ccg aca aca tcc ccc atg tcg cca agt agt tct tca gct tca gga 594
 Asp Pro Thr Thr Ser Pro Met Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ala Ser Gly
 150 155 160
 cat gaa gac cct ttg ggg att atg ggc gtt aac aga cgg agg tcg cta 642
 His Glu Asp Pro Leu Gly Ile Met Gly Val Asn Arg Arg Arg Ser Leu
 165 170 175
 tta gaa gga gtt tcg ctt gat gtt ccg tca cat atc gac tcc aag gtc 690
 Leu Glu Gly Val Ser Leu Asp Val Pro Ser His Ile Asp Ser Lys Val
 180 185 190 195
 aga ata tct cct gtt ccc tac ttg agg ctc aaa aag tct agg gca acg 738
 Arg Ile Ser Pro Val Pro Tyr Leu Arg Leu Lys Lys Ser Arg Ala Thr
 200 205 210
 aag gcg caa tgg gtg aaa gaa aag gga aga tta cca ttt ttg aca gtg 786
 Lys Ala Gln Trp Val Lys Glu Lys Gly Arg Leu Pro Phe Leu Thr Val
 215 220 225
 tac cga gcg cac atg atg ctc atg act gtt atc tgc atc ttg gcg gta 834
 Tyr Arg Ala His Met Met Leu Met Thr Val Ile Cys Ile Leu Ala Val
 230 235 240
 gat ttt gaa gtg ttt cct aga tgg cag ggc aag tgc gaa gat ttt ggt 882
 Asp Phe Glu Val Phe Pro Arg Trp Gln Gly Lys Cys Glu Asp Phe Gly
 245 250 255
 act agt ctg gtaagctttc cttcagccat ggtccagtgc tcaccgctct 931
 Thr Ser Leu
 260

67/83

acttgccgta g atg gac gtg ggt gtc ggg tca ttc gtc ttt tcc ctc ggt 981
 Met Asp Val Gly Val Gly Ser Phe Val Phe Ser Leu Gly
 265 270 275

ctc gtc tcc aca aaa tct ctt tct cct cca cct cca act cct acg ccc 1029
 Leu Val Ser Thr Lys Ser Leu Ser Pro Pro Pro Pro Thr Pro Thr Pro
 280 285 290

tcc tcg ccc gct ctc aac tct cac atc att ccc ctc acc ccg tcc ccg 1077
 Ser Ser Pro Ala Leu Asn Ser His Ile Ile Pro Leu Thr Pro Ser Pro
 295 300 305

ttc act tcc atc ctc atc tcg ctc cga aaa tcc atc ccc atc ctc gtc 1125
 Phe Thr Ser Ile Leu Ile Ser Leu Arg Lys Ser Ile Pro Ile Leu Val
 310 315 320

ctc ggc ttt ata cgg ttg att atg gtc aag gga tct gat tat cct gag 1173
 Leu Gly Phe Ile Arg Leu Ile Met Val Lys Gly Ser Asp Tyr Pro Glu
 325 330 335

cat gtg acg gag tac ggc gtg cac tgg aat ttc ttc ttc acc ctc gca 1221
 His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe Thr Leu Ala
 340 345 350 355

ttg gtt cct gtg ctc gcc gtg ggc att cga cca ttg acg cag tgg ctt 1269
 Leu Val Pro Val Leu Ala Val Gly Ile Arg Pro Leu Thr Gln Trp Leu
 360 365 370

cgc tgg agt gtg ctt ggg gta atc atc tct ttg ctg cat cag ctg tgg 1317
 Arg Trp Ser Val Leu Gly Val Ile Ile Ser Leu Leu His Gln Leu Trp
 375 380 385

tta aca tat tat ctc caa tcc atc gtc ttc tca ttc ggc cgg tca ggt 1365
 Leu Thr Tyr Tyr Leu Gln Ser Ile Val Phe Ser Phe Gly Arg Ser Gly

68/83

390	395	400	
atc ttt cta gca aac aag gaa ggc ttc tcc tct ctt cct ggt tat ctt			1413
Ile Phe Leu Ala Asn Lys Glu Gly Phe Ser Ser Leu Pro Gly Tyr Leu			
405	410	415	
tcc ata ttt ttg atc ggc ttg tct att gga gat cat gtt tta agg ctc			1461
Ser Ile Phe Leu Ile Gly Leu Ser Ile Gly Asp His Val Leu Arg Leu			
420	425	430	435
agt tta cca cca aga aga gag agg gtc gtg tca gaa aca aat gaa gag			1509
Ser Leu Pro Pro Arg Arg Glu Arg Val Val Ser Glu Thr Asn Glu Glu			
	440	445	450
cat gag cag agt cat ttt gag aga aaa aaa ttg gat ttg att atg gag			1557
His Glu Gln Ser His Phe Glu Arg Lys Lys Leu Asp Leu Ile Met Glu			
	455	460	465
ttg att gga tat agc tta ggc tgg tgg gca ctc tta gga ggc tgg att			1605
Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Trp Trp Ala Leu Leu Gly Gly Trp Ile			
470	475	480	
tgg gcc ggc ggg gag gta tcc agg cgt tta gtaagtggac atcttttgta			1655
Trp Ala Gly Gly Glu Val Ser Arg Arg Leu			
485	490		
atattgtacc tataactaatc cctgcataaa g gcc aac gct cct tat gta ttt			1707
		Ala Asn Ala Pro Tyr Val Phe	
	495	500	
tgg gta gcg gca tac aat acc acc ttt ctc ctc ggc tac ctc ctc ctt			1755
Trp Val Ala Ala Tyr Asn Thr Thr Phe Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Leu			
	505	510	515
acc cac att att cca tct ccc acc tct tcc caa aca tca cca tcg atc			1803

69/83

Thr His Ile Ile Pro Ser Pro Thr Ser Ser Gln Thr Ser Pro Ser Ile
 520 525 530
 tta gtg cct ccc ttg ctc gac gct atg aat aaa aac ggt ctc gcg ata 1851
 Leu Val Pro Pro Leu Leu Asp Ala Met Asn Lys Asn Gly Leu Ala Ile
 535 540 545
 ttt ttg gcg gcc aac ttg ctt aca gga ctg gtg aat gtg agc atg aag 1899
 Phe Leu Ala Ala Asn Leu Leu Thr Gly Leu Val Asn Val Ser Met Lys
 550 555 560
 aca atg tat gcg ccg gcg tgg ttg tca atg ggg gtg tta atg ttg tat 1947
 Thr Met Tyr Ala Pro Ala Trp Leu Ser Met Gly Val Leu Met Leu Tyr
 565 570 575 580
 acc ttg aca atc agt tgt gta ggg tgg ata ctg aaa gga cgg agg atc 1995
 Thr Leu Thr Ile Ser Cys Val Gly Trp Ile Leu Lys Gly Arg Arg Ile
 585 590 595
 aag ata tagttaaagt gtttaccatg caggatactg agtatctcgg ttca 2045
 Lys Ile

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 55

cagcctggtc gcactggcga cat

23

70/83

<210> 56

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 56

cataaggagc gttggctaaa cgcct

25

<210> 57

<211> 1418

<212> DNA

<213> Cryptococcus neoformans

<400> 57

cagcctggtc gcaactggca catatgctct ctggatgcc ttatcgccgt acatccgtca 60
tggactcctg aacaactacc tgatctgtgt tcttccccta ttattcgggg tgaccatctt 120
ctcaacttcg cctctcgtat ttacctcttt tttgtccatt atttccctcg ctttcatcac 180
gaaatcccaa aaatgcttca aatctgtcag ttcgcccga aagccaaaag gccaatggct 240
agacgaatca gactccgatg aggaaccagc ggaacctgct tctgcagctg gatctgcagc 300
agtctcacca gtaaagcttc taccttccca agtggcgctt gcttcgggat ccctattatc 360
tcccgatccg acaacatccc ccatgtgcc aagtagttct tcagcttcag gacatgaaga 420
ccctttgggg attatgggcg ttaacagacg gaggtcgcta ttagaaggag tttcgcttga 480
tgttccgtca catatcgact ccaaggtcag aatatctcct gttccctact tgaggctcaa 540
aaagtctagg gcaacgaagg cgcaatgggt gaaagaaaag ggaagattac catttttgac 600

71/83

agtgtaccga ggcacatga tgctcatgac tgttatctgc atcttggcgg tagattttga 660
agtgtttcct agatggcagg gcaagtgcga agattttggt actagtctga tggacgtggg 720
tgtcgggtca ttcgtctttt ccctcggctc cgtctccaca aaatctcttt ctctccacc 780
tccaactcct acgccctcct cgcccgtct caactctcac atcattcccc tcaccccgtc 840
cccgttcact tccatcctca tctcgtccg aaaatccatc cccatcctcg tctcggctt 900
tatacggttg attatggtca agggatctga ttatcctgag catgtgacgg agtacggcgt 960
gcactggaat ttcttcttca cctcgcatt ggttcctgtg ctgccgtgg gcattcgacc 1020
attgacgcag tggcttcgct ggagtgtgct tggggtaatc atctctttgc tgcacagct 1080
gtggttaaca tattatctcc aatccatcgt cttctcattc ggccggtcag gtatctttct 1140
agcaaacaag gaaggttct cctctcttcc tggttatctt tccatatttt tgatcggctt 1200
gtctattgga gatcatgttt taaggctcag tttaccacca agaagagaga gggtcgtgtc 1260
agaaacaaat gaagagcatg agcagagtca tttgagaga aaaaaattgg atttgattat 1320
ggagttgatt ggatatagct taggctggtg ggcactctta ggaggctgga tttgggccgg 1380
cggggaggta tccaggcgtt tagccaacgc tccttatg 1418

<210> 58

<211> 1797

<212> DNA

<213> *Cryptococcus neoformans*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1794)

<400> 58

72/83

atg ggg gat tac aag tcg gcc aaa gag gcc ttt gtc tcg gat aac cca	48
Met Gly Asp Tyr Lys Ser Ala Lys Glu Ala Phe Val Ser Asp Asn Pro	
1 5 10 15	
ggt gct tct atc tgg agt atc aac gct gtc agc ctg gtc gca ctg gcg	96
Gly Ala Ser Ile Trp Ser Ile Asn Ala Val Ser Leu Val Ala Leu Ala	
20 25 30	
aca tat gct ctc tgg atc gcc tta tcg ccg tac atc cgt cat gga ctc	144
Thr Tyr Ala Leu Trp Ile Ala Leu Ser Pro Tyr Ile Arg His Gly Leu	
35 40 45	
ctg aac aac tac ctg atc tgt gtt ctt ccc cta tta ttc ggg gtg acc	192
Leu Asn Asn Tyr Leu Ile Cys Val Leu Pro Leu Leu Phe Gly Val Thr	
50 55 60	
atc ttc tca act tcg cct ctc gta ttt acc tct ttt ttg tcc att att	240
Ile Phe Ser Thr Ser Pro Leu Val Phe Thr Ser Phe Leu Ser Ile Ile	
65 70 75 80	
tcc ctc gct ttc atc acg aaa tcc caa aaa tgc ttc aaa tct gtc agt	288
Ser Leu Ala Phe Ile Thr Lys Ser Gln Lys Cys Phe Lys Ser Val Ser	
85 90 95	
tcg ccc gaa aag cca aaa ggc caa tgg cta gac gaa tca gac tcc gat	336
Ser Pro Glu Lys Pro Lys Gly Gln Trp Leu Asp Glu Ser Asp Ser Asp	
100 105 110	
gag gaa cca gcg gaa cct gct tct gca gct gga tct gca gca gtc tca	384
Glu Glu Pro Ala Glu Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Val Ser	
115 120 125	
cca gta aag ctt cta cct tcc caa gtg gcg ttc gct tcg gga tcc cta	432
Pro Val Lys Leu Leu Pro Ser Gln Val Ala Phe Ala Ser Gly Ser Leu	

73/83

130	135	140	
tta tct ccc gat ccg aca aca tcc ccc atg tcg cca agt agt tct tca	480		
Leu Ser Pro Asp Pro Thr Thr Ser Pro Met Ser Pro Ser Ser Ser Ser			
145	150	155	160
gct tca gga cat gaa gac cct ttg ggg att atg ggc gtt aac aga cgg	528		
Ala Ser Gly His Glu Asp Pro Leu Gly Ile Met Gly Val Asn Arg Arg			
165	170	175	
agg tcg cta tta gaa gga gtt tcg ctt gat gtt ccg tca cat atc gac	576		
Arg Ser Leu Leu Glu Gly Val Ser Leu Asp Val Pro Ser His Ile Asp			
180	185	190	
tcc aag gtc aga ata tct cct gtt ccc tac ttg agg ctc aaa aag tct	624		
Ser Lys Val Arg Ile Ser Pro Val Pro Tyr Leu Arg Leu Lys Lys Ser			
195	200	205	
agg gca acg aag gcg caa tgg gtg aaa gaa aag gga aga tta cca ttt	672		
Arg Ala Thr Lys Ala Gln Trp Val Lys Glu Lys Gly Arg Leu Pro Phe			
210	215	220	
ttg aca gtg tac cga gcg cac atg atg ctc atg act gtt atc tgc atc	720		
Leu Thr Val Tyr Arg Ala His Met Met Leu Met Thr Val Ile Cys Ile			
225	230	235	240
ttg gcg gta gat ttt gaa gtg ttt cct aga tgg cag ggc aag tgc gaa	768		
Leu Ala Val Asp Phe Glu Val Phe Pro Arg Trp Gln Gly Lys Cys Glu			
245	250	255	
gat ttt ggt act agt ctg atg gac gtg ggt gtc ggg tca ttc gtc ttt	816		
Asp Phe Gly Thr Ser Leu Met Asp Val Gly Val Gly Ser Phe Val Phe			
260	265	270	
tcc ctc ggt ctc gtc tcc aca aaa tct ctt tct cct cca cct cca act	864		

74/83

Ser Leu Gly Leu Val Ser Thr Lys Ser Leu Ser Pro Pro Pro Thr	
275	280
cct acg ccc tcc tcg ccc gct ctc aac tct cac atc att ccc ctc acc	912
Pro Thr Pro Ser Ser Pro Ala Leu Asn Ser His Ile Ile Pro Leu Thr	
290	295
ccg tcc ccg ttc act tcc atc ctc atc tcg ctc cga aaa tcc atc ccc	960
Pro Ser Pro Phe Thr Ser Ile Leu Ile Ser Leu Arg Lys Ser Ile Pro	
305	310
atc ctc gtc ctc ggc ttt ata cgg ttg att atg gtc aag gga tct gat	1008
Ile Leu Val Leu Gly Phe Ile Arg Leu Ile Met Val Lys Gly Ser Asp	
325	330
tat cct gag cat gtg acg gag tac ggc gtg cac tgg aat ttc ttc ttc	1056
Tyr Pro Glu His Val Thr Glu Tyr Gly Val His Trp Asn Phe Phe Phe	
340	345
acc ctc gca ttg gtt cct gtg ctc gcc gtg ggc att cga cca ttg acg	1104
Thr Leu Ala Leu Val Pro Val Leu Ala Val Gly Ile Arg Pro Leu Thr	
355	360
cag tgg ctt cgc tgg agt gtg ctt ggg gta atc atc tct ttg ctg cat	1152
Gln Trp Leu Arg Trp Ser Val Leu Gly Val Ile Ile Ser Leu Leu His	
370	375
cag ctg tgg tta aca tat tat ctc caa tcc atc gtc ttc tca ttc ggc	1200
Gln Leu Trp Leu Thr Tyr Tyr Leu Gln Ser Ile Val Phe Ser Phe Gly	
385	390
cgg tca ggt atc ttt cta gca aac aag gaa ggc ttc tcc tct ctt cct	1248
Arg Ser Gly Ile Phe Leu Ala Asn Lys Glu Gly Phe Ser Ser Leu Pro	
405	410
	415

75/83

ggt tat ctt tcc ata ttt ttg atc ggc ttg tct att gga gat cat gtt	1296
Gly Tyr Leu Ser Ile Phe Leu Ile Gly Leu Ser Ile Gly Asp His Val	
420 425 430	
tta agg ctc agt tta cca cca aga aga gag agg gtc gtg tca gaa aca	1344
Leu Arg Leu Ser Leu Pro Pro Arg Arg Glu Arg Val Val Ser Glu Thr	
435 440 445	
aat gaa gag cat gag cag agt cat ttt gag aga aaa aaa ttg gat ttg	1392
Asn Glu Glu His Glu Gln Ser His Phe Glu Arg Lys Lys Leu Asp Leu	
450 455 460	
att atg gag ttg att gga tat agc tta ggc tgg tgg gca ctc tta gga	1440
Ile Met Glu Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Trp Trp Ala Leu Leu Gly	
465 470 475 480	
ggc tgg att tgg gcc gcc ggg gag gta tcc agg cgt tta gcc aac gct	1488
Gly Trp Ile Trp Ala Gly Gly Glu Val Ser Arg Arg Leu Ala Asn Ala	
485 490 495	
cct tat gta ttt tgg gta gcg gca tac aat acc acc ttt ctc ctc ggc	1536
Pro Tyr Val Phe Trp Val Ala Ala Tyr Asn Thr Thr Phe Leu Leu Gly	
500 505 510	
tac ctc ctc ctt acc cac att att cca tct ccc acc tct tcc caa aca	1584
Tyr Leu Leu Leu Thr His Ile Ile Pro Ser Pro Thr Ser Ser Gln Thr	
515 520 525	
tca cca tcg atc tta gtg cct ccc ttg ctc gac gct atg aat aaa aac	1632
Ser Pro Ser Ile Leu Val Pro Pro Leu Leu Asp Ala Met Asn Lys Asn	
530 535 540	
ggt ctc gcg ata ttt ttg gcg gcc aac ttg ctt aca gga ctg gtg aat	1680
Gly Leu Ala Ile Phe Leu Ala Ala Asn Leu Leu Thr Gly Leu Val Asn	

76/83

545 550 555 560
 gtg agc atg aag aca atg tat gcg ccg gcg tgg ttg tca atg ggg gtg 1728
 Val Ser Met Lys Thr Met Tyr Ala Pro Ala Trp Leu Ser Met Gly Val
 565 570 575
 tta atg ttg tat acc ttg aca atc agt tgt gta ggg tgg ata ctg aaa 1776
 Leu Met Leu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Cys Val Gly Trp Ile Leu Lys
 580 585 590
 gga cgg agg atc aag ata tag 1797
 Gly Arg Arg Ile Lys Ile
 595

<210> 59

<211> 598

<212> PRT

<213> *Cryptococcus neoformans*

<400> 59

Met Gly Asp Tyr Lys Ser Ala Lys Glu Ala Phe Val Ser Asp Asn Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Ser Ile Trp Ser Ile Asn Ala Val Ser Leu Val Ala Leu Ala
 20 25 30
 Thr Tyr Ala Leu Trp Ile Ala Leu Ser Pro Tyr Ile Arg His Gly Leu
 35 40 45
 Leu Asn Asn Tyr Leu Ile Cys Val Leu Pro Leu Leu Phe Gly Val Thr
 50 55 60

77/83

Ile Phe Ser Thr Ser Pro Leu Val Phe Thr Ser Phe Leu Ser Ile Ile
 65 70 75 80
 Ser Leu Ala Phe Ile Thr Lys Ser Gln Lys Cys Phe Lys Ser Val Ser
 85 90 95
 Ser Pro Glu Lys Pro Lys Gly Gln Trp Leu Asp Glu Ser Asp Ser Asp
 100 105 110
 Glu Glu Pro Ala Glu Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ser Ala Ala Val Ser
 115 120 125
 Pro Val Lys Leu Leu Pro Ser Gln Val Ala Phe Ala Ser Gly Ser Leu
 130 135 140
 Leu Ser Pro Asp Pro Thr Thr Ser Pro Met Ser Pro Ser Ser Ser Ser
 145 150 155 160
 Ala Ser Gly His Glu Asp Pro Leu Gly Ile Met Gly Val Asn Arg Arg
 165 170 175
 Arg Ser Leu Leu Glu Gly Val Ser Leu Asp Val Pro Ser His Ile Asp
 180 185 190
 Ser Lys Val Arg Ile Ser Pro Val Pro Tyr Leu Arg Leu Lys Lys Ser
 195 200 205
 Arg Ala Thr Lys Ala Gln Trp Val Lys Glu Lys Gly Arg Leu Pro Phe
 210 215 220
 Leu Thr Val Tyr Arg Ala His Met Met Leu Met Thr Val Ile Cys Ile
 225 230 235 240
 Leu Ala Val Asp Phe Glu Val Phe Pro Arg Trp Gln Gly Lys Cys Glu
 245 250 255
 Asp Phe Gly Thr Ser Leu Met Asp Val Gly Val Gly Ser Phe Val Phe
 260 265 270

Ser	Leu	Gly	Leu	Val	Ser	Thr	Lys	Ser	Leu	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Thr
275				280				285							
Pro	Thr	Pro	Ser	Ser	Pro	Ala	Leu	Asn	Ser	His	Ile	Ile	Pro	Leu	Thr
290				295				300							
Pro	Ser	Pro	Phe	Thr	Ser	Ile	Leu	Ile	Ser	Leu	Arg	Lys	Ser	Ile	Pro
305				310				315				320			
Ile	Leu	Val	Leu	Gly	Phe	Ile	Arg	Leu	Ile	Met	Val	Lys	Gly	Ser	Asp
325				330				335							
Tyr	Pro	Glu	His	Val	Thr	Glu	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Asn	Phe	Phe	Phe
340				345				350							
Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Pro	Val	Leu	Ala	Val	Gly	Ile	Arg	Pro	Leu	Thr
355				360				365							
Gln	Trp	Leu	Arg	Trp	Ser	Val	Leu	Gly	Val	Ile	Ile	Ser	Leu	Leu	His
370				375				380							
Gln	Leu	Trp	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Gln	Ser	Ile	Val	Phe	Ser	Phe	Gly
385				390				395				400			
Arg	Ser	Gly	Ile	Phe	Leu	Ala	Asn	Lys	Glu	Gly	Phe	Ser	Ser	Leu	Pro
405				410				415							
Gly	Tyr	Leu	Ser	Ile	Phe	Leu	Ile	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Asp	His	Val
420				425				430							
Leu	Arg	Leu	Ser	Leu	Pro	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Val	Val	Ser	Glu	Thr
435				440				445							
Asn	Glu	Glu	His	Glu	Gln	Ser	His	Phe	Glu	Arg	Lys	Lys	Leu	Asp	Leu
450				455				460							
Ile	Met	Glu	Leu	Ile	Gly	Tyr	Ser	Leu	Gly	Trp	Trp	Ala	Leu	Leu	Gly
465				470				475				480			

79/83

Gly Trp Ile Trp Ala Gly Gly Glu Val Ser Arg Arg Leu Ala Asn Ala

485

490

495

Pro Tyr Val Phe Trp Val Ala Ala Tyr Asn Thr Thr Phe Leu Leu Gly

500

505

510

Tyr Leu Leu Leu Thr His Ile Ile Pro Ser Pro Thr Ser Ser Gln Thr

515

520

525

Ser Pro Ser Ile Leu Val Pro Pro Leu Leu Asp Ala Met Asn Lys Asn

530

535

540

Gly Leu Ala Ile Phe Leu Ala Ala Asn Leu Leu Thr Gly Leu Val Asn

545

550

555

560

Val Ser Met Lys Thr Met Tyr Ala Pro Ala Trp Leu Ser Met Gly Val

565

570

575

Leu Met Leu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Cys Val Gly Trp Ile Leu Lys

580

585

590

Gly Arg Arg Ile Lys Ile

595

<210> 60

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

80/83

<400> 60

aaagaattca tggcaacagt acatcagaag

30

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 61

gggcactgtt gaaaaaccta

20

<210> 62

<211> 1428

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1428)

<400> 62

81/83

gttgttcaaa atgggggtaa aattgagacg tcttacttga gcggcattta cgatcattct 60
 tattacatca ttccaagtaa taaagctctt gactccttca atgatttacc tgagattata 120
 gatgataatg atggtatagt tacagaattt ttcattgaac gctgcttgta ttatcaaaaa 180
 ttactacacc caatagattt atggtcaaaa cccttctca gcacaataga gtttcaagtt 240
 tcgtcttctt caaagttatt gcatcatgaa ttttcttctt ccccttttct gaatgttact 300
 atcactggat tctctggcgt agagctgtta catctgacta aagtattaaa tcttctaaaa 360
 ccaatgggca tcaattatgt agaatacctc aataaatcca ctgacattct gctaatcaac 420
 ttagcagctt taccagtat cccgaaaacc catcgttat ggtcgaatga atttagcgat 480
 ctttttactc agttttgcat taataacaat aatgatgac ctggtgataa taacagaaaa 540
 gattttcaaa ataattcaat ctgagaaat tcgatgaaaa ggaaaattga atatatcaag 600
 aaattccact ccataccggt agttactcca gcatttattt tttaaattatt gtccgctgca 660
 tctggagaaa ataatgaaat ctttttaaac aatatcaagt ggtgtattat ctgccaaga 720
 ggacacaagg acgattttta atgtaagata aaaaaacat actataccag cattagtcca 780
 gaaaaaaagt accaaaacaa tgatccaaaa atcgacaaaa ctattctttt gaaaagaaac 840
 aattcctcat tatcgagca ctctatgaaa gataccaaaa acgaattatt gcagaaaatt 900
 agagaaactg attctggaag aaaaaagcgt agtgtctcat cgagtatcat ggatgtttct 960
 tcagagagac aaatgccgga tacgaaaagg atcaagttgg agtcactgcc aaaaaatttc 1020
 gttcctaaac aaattaaacg aaccacgagt tggggcacia taatgtcaga aaatgtgcct 1080
 acagagcagc cgactgcaat ttctaatacca gaagagatcc caagaactga ggaagtttca 1140
 catactcaag ttacctatgg ctccattcaa gataagaaac gtactgcctc tttagaaaaa 1200
 cctatgagac gacagacaag aaatcagaca aaggaattag attcttgaaa ttagtccgt 1260
 aattttataa gatattcatt tacatacgcc atctacagca ttattcaaat ctactcatct 1320
 atatgtatta ccgttttgta tgataaact ttccatgaca tgctcgctg aaaaaacagc 1380
 atgagaaaaa gaggatcgca ataagaagac acgtaaatat ctaaataa 1428

82/83

<210> 63

<211> 133

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> terminator

<222> (1)..(133)

<400> 63

```
taacacacca tccacatttc catgtagttc gtatacaaac cctaccagta aaataaaatt   60
aactcctatg tgctttaaat aaaaattata aaccgcctcc aatagttgac gtagtcaggc  120
atgaaagtgc tac                                                         133
```

<210> 64

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 64

```
ggaattcatg tcgactttaa aacagagaaa agagg                                     35
```

<210> 65

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

83/83

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 65

gcatcgattt atagcttaat gaatattctt tttct atac

34

<210> 66

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 66

ttgagaattc accatgtcat cgtctttaa acaa

34

<210> 67

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 67

gaagtcgacc taaagcttga tgtagatctt cctctt

36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/15, G01N33/50, G01N33/566, A61K45/00, A61P31/10,
C07K14/195, C07K14/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/15, G01N33/50, G01N33/566, A61K45/00, A61P31/10,
C07K14/195, C07K14/37

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA, REG, Genbank/EMBL/DDBJ/PIR/SwissProt/Genseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4013666 A (G.D. Searle & Co.), 22 March, 1977 (22.03.77), (Family: none)	1-7
A	WO 00/01387 A (CELGRO, a division of CELEGENE CORP.), 13 January, 2000 (13.01.00), & AU 9948491 A	1-7
A	KAWARABAYASHI et al., "Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic Crenarchaeon, Aeropyrum pernix K1", DNA Res., 1999 Vol.6, pages 83 to 101	1-7
P,X	WO 02/04626 A (Eisai Co., Ltd.), 17 January, 2002 (17.01.02), & AU 6947201 A	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
31 January, 2003 (31.01.03)

Date of mailing of the international search report
12 February, 2003 (12.02.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/15, G01N33/50, G01N33/566, A61K45/00, A61P31/10, C07K14/195, C07K14/37

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/15, G01N33/50, G01N33/566, A61K45/00, A61P31/10, C07K14/195, C07K14/37

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA, REG, Genbank/EMBL/DDBJ/PIR/SwissProt/Genseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 4013666 A (G.D.Searle & Co.) 1977.03.22(ファミリーなし)	1-7
A	WO 00/01387 A (CELGRO, a division of CELEGENE CORPORATION) 2000.01.13 & AU 9948491 A	1-7
A	Kawarabayashi et al' Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic Crenarchaeon, Aeropyrum pernix K1' DNA Res., 1999 Vol.6 p83-101	1-7
PX	WO 02/04626 A (エーザイ株式会社) 2002.01.17 & AU 6947201 A	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31.01.03

国際調査報告の発送日

12.02.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

2 J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.